

VIVIAN FERNANDA PAVESI CARVALHO

**FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CRISTAIS DE
PROTEÍNAS USANDO MÉTODOS DE FILMES FINOS**

**CURITIBA
2011**

VIVIAN FERNANDA PAVESI CARVALHO

**FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CRISTAIS DE
PROTEÍNAS USANDO MÉTODOS DE FILMES FINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César de Camargo

Co- Orientador: Dr Elaine Benelli

**CURITIBA
2011**

AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, “Razão de tudo o que somos e fazemos”.
 - A minha filha Letícia Maria Pavesi Carvalho pela compreensão e maturidade, por entender as necessidades de deixá-la longe de mim neste período.
 - Ao meu esposo Claudemar de Mello Carvalho por todo seu amor, paciência e dedicação fundamentais durante a realização deste trabalho.
 - Ao Prof. Dr. Paulo César de Camargo pela orientação, ensinamentos e paciência e dedicação ao longo da realização da pesquisa.
- A Prof. Dr Elaine Benelli, por fornecer a Lisozima e pela atenção fundamental para o desenvolvimento deste trabalho
- A Cecília Fabiana da Gama que pacientemente e com grande empenho e amor a pesquisa me auxiliou em todas as etapas desse trabalho.
 - Ao professor Ney Matoso pelas medidas de MET e ajuda com as análises.
 - Ao mestrando Vinícius de Souza Oliveira pela preparação das NP de Au, medidas de DSL e pelos artigos cedidos.
 - Aos meus pais Celso e Sônia por todos os anos e esforços dedicados a minha formação como pessoa.
 - A minha “irmãzinha” Alexandra que tanto amo por ser tão especial e paciente comigo.
 - Aos meus avós, tios e primos e a minha sogra que apesar da distância estiveram sempre presentes me incentivando e apoiando em cada passo desta caminhada
 - As minhas amigas Angeline, Marjorie, Luciane e Jacqueline pelo apoio durante os “sufocos” das disciplinas que realizamos juntas.
 - A minha querida amiga Ana Paula Vaz pelo incentivo e apoio para que eu pudesse voltar a estudar depois de tanto tempo.
 - A Direção do Colégio Estadual Xavier da Silva por todos esses anos de apoio e incentivo.
 - E a todos os demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação.

Lista de Figuras

Figura 2.1- Método de Ablação(evaporação do metal) a Laser - Esquemático.....	05
Figura 2.2- Imagem de M.F.A.de nanopartículas de ouro sintetizadas na superfície de micélio fúngico,baixa resolução(a); alta resolução(b).....	05
Figura 2.3- O grupo carboxila de um aminoácido é ligado ao grupo amino de um segundo por uma ligação peptídica.....	06
Figura 2.4 - Níveis de organização das proteínas	08
Figura 2.5- Lisozima com vários componentes do sítio ativo mostrado em cores.....	09
Figura 2.6 - A reação catalisada pela lisozima. A enzima lisozima (indicado como E) catalisa a redução de uma cadeia de polissacarídeo, que é seu substrato (S). A primeira enzima se liga à cadeia para formar uma complexo enzima-substrato (ES) e, em seguida, catalisa a quebra do substrato	10
Figura 2.7- Aspecto nanofilme de citocromos, uma proteína de membrana relacionada com a biossíntese de esteróides, determinados pormicroscopia de força atômica.....	11
Figura 2.8- cristais (A) GroEL, obtidos por método LB (Langmuir–Blodgett) sob o microscópio de luz (dimensões dos cristais são cerca de $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$), (B) da agulha GroEL microcristais, obtidas por LB método sob o microscópio de luz (cristais de dimensões são cerca de $100\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$); microcristais (C) um da agulha montado no cryoloop, corresponde a $50\mu\text{m}$); cristais (D) GroEL obtido pelo método clássico gota de suspensão (dimensões cristais são cerca $50\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$)	13
Figura 2.9 - Desenho Esquemático da Técnica de EDL.....	17
Figura 2.10 - Representação da estrutura de um cristal de lisozima, mostrando as dimensões geométricas axial, o diâmetro da esfera rígida (vermelho)para a proteína de 14,7 kDa (volume específico = $0,73 \text{ g / mL}$). , o diâmetro hidrodinâmico (verde) calculado a partir do coeficiente de difusão, e um elipsóide com o difusional mesmas propriedades da proteína (preto).....	18
Figura 2.11 - Célula unitária do NaCl.....	20
Figura 2.12- Grade de cobre usada para o preparo de filmes para análise em MET	21
Figura 2.13- Tipos característicos de figuras de difração	21

Figura 2. 14- Formação de imagem de material cristalino, bloqueando-se o feixe difratado para melhor resolução e contraste da imagem de interesse. (esquemático).....	23
Figura 2.15- Célula unitária do NaCl	24
Figura 2.16- Célula unitária de uma estrutura ortorrômbica.....	24
Figura 2.17- Macromolécula de Lisozima comparada com açúcar.	24
Figura 2.18- Representação dos parâmetros de uma cela unitária.	25
Figura 2.19- Redes de Bravais	27
Figura 2.20- O plano ilustrado na fig.2. 20 intercepta o eixo x na posição 1, é paralelo aos eixos y e z, então os índices de Miller serão $h = 1$, $k = 0$ e $l = 0$	28
Figura 2.21- O plano ilustrado na fig.2.21 intercepta o eixo x na posição 1, o eixo y na posição -1,e é paralelo ao eixo z, então os índices de Miller serão $h = 1$, $k = -1$ e $l = 0$	29
Figura 2.22- Relação entre comprimento de onda, espaçamento interplanar e ângulo de difração para interferência construtiva	30
Figura 2.23- Desenho da difração evidenciando o ângulo de Bragg.	31
Figura 2.24- Representação dos planos (110), (120) e (130) considerando-se uma origem arbitrária, indicada por 0 traça-se um vetor perpendicular aos planos com tamanho $1/d_{hkl}$, assim temos os pontos do espaço recíproco no final desse vetor	32
Figura 2.25- Esfera de Ewald	33
Figura 2.26- Esfera Limite	34
Figura 3.1- desenho esquemático do método da “gota”	38
Figura 3.2- desenho esquemático do método de “drop-deposition”	38
Figura 4.1- Gráfico da distribuição de diâmetros das partículas de lisozima em solução determinados por EDL, juntamente com as imagens de MET de cristais de lisozima aderidos à GC.....	39

Figura 4.2- Gráfico da distribuição de diâmetros das partículas de lisozima em solução.....	40
Figura 4.3- Topografia da GC	41
Figura 4.4- Filme resultante de solução 10 mM de lisozima depositado sobre a GC.....	42
Figura 4.5-(a) aspecto do filme de solução lisozima +Au com tempo de incubação de 5s, (b) detalhe com aumento de 2X, (c) aspecto do filme de solução lisozima +Au com tempo de incubação de 10s. (d) detalhe com aumento de 2X. Nota-se 4,5,6	
Figura 4.6- Imagem de uma GC após o depósito de lisozima, mostrando a distribuição irregular do filme depositado.....	44
Figura 4.7- imagem de cristais de lisozima(a); imagem ampliada de um cristal de lisozima(b); figura de difração do cristal de lisozima(c)	45
Figura 4.8- (a) imagem de uma região onde está ocorrendo difração, (b)ampliação da imagem.(c) ampliação da imagem mostrando NP de Au. (d)figura de difração na região das NP de Au	46
Figura 4.9-(a) imagem com uma NP de Au de aproximadamente 40nm, (b)imagem possivelmente de um cristal de lisozima, (c)figura de difração do cristal de lisozima..	47
Figura 4.10- imagem de um cristal possivelmente de lisozima e figura de difração da mesma região.	48
Figura 4.11-(a) imagem de uma região com muitos cristais, (b)figura de difração de um monocristal possivelmente de lisozima, (c)imagem de um cristal e figura de difração deste, (d) e (e) detalhes da difração provavelmente do cristal de lisozima.	50
Figura 4.12- Projeção estereográfica da lisozima tetragonal com direção de feixe incidente, a) $[0\ 1\ 0]$, b) direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$ e c)direção de feixe incidente $[0\ 0\ 1]$	51
Figura 4.13- a) Projeção estereográfica da lisozima ortorrômbica com direção de feixe incidente $[0\ 0\ 1]$, b) direção de feixe incidente $[0\ 1\ 0]$ e c) direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$	52
Figura 4.14- Imagem da sobreposição da imagem obtida por MET de cristal de lisozima obtido experimentalmente e da projeção estereográfica da lisozima ortorrômbica com	

parâmetros de célula unitária $a = 31\text{\AA}$, $b = 52,5\text{\AA}$ e $c = 89\text{\AA}$. com direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$	53
Figura 4.15- Imagem da sobreposição da imagem obtida por MET de cristal de lisozima obtido experimentalmente e da projeção estereográfica da lisozima ortorrômbica com parâmetros de célula unitária $a = 31\text{\AA}$, $b = 52,5\text{\AA}$ e $c = 89\text{\AA}$. com direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$	54
Figura 4.16- Detalhes da figura 4.11(e)	54
Figura 4.17- Indexação da orientação dos planos cristalográficos para a figura 4.11(b) de difração.	59
Figura 4.18- Indexação da orientação dos planos cristalográficos na figura 4.11d.	60
Figura 4.19- Demonstração da regra do paralelograma da figura 4.18.	61
Figura 4.20- Comparação entre as figuras 4.11b de um monocristal com a figura de um policristal 4.11 e	62

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Relação entre os 7 tipos de simetria e os parâmetros de célula unitária.....	26
Tabela 4.1. Relação dos os ângulos entre os planos com índices (h_1, k_1, l_1) com aqueles (h_2, k_2, l_2)	55
Tabela 4.2 Planos (h,k,l) possíveis de observação na geometria deste experimento e perpendiculares a direção do feixe incidente $[1,0,0]$	56
Tabela 4.3 Valores indicados para as determinadas direções da projeção estereográfica considerando a figura 4.17	58
Tabela 4.4 Valores indicados para as determinadas direções da projeção estereográfica considerando a figura 4.17.	60

Lista de Abreviaturas

Comprimento:	Å ångström (10^{-10} m) nm nanometro (10^{-9} m) µm micrometro (10^{-6} m)
Massa:	Da dalton ($1u = 1,7 \cdot 10^{-23}$ kg)
GC	Grade de cobre revestida com filme fino de carbono bacteriano(GC)
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MFA	Microscópio de Força Atômica

Resumo

A cristalização da lisozima sobre a superfície de grade de cobre revestida com filme fino de carbono bacteriano (GC) para microscopia de transmissão foi analisada por microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A lisozima é uma proteína globular, que atua como enzima antibacteriana, hidrolisando uma porção da parede celular de algumas bactérias, sendo assim conhecida como um antibiótico natural. A solução da lisozima foi depositada por diferentes métodos sobre a superfície de GC. Além da deposição da solução de lisozima, foram também utilizadas nano partículas (NP) de ouro como nucleantes. Os cristais formados com e sem NP de Au e em diferentes concentrações, foram analisados por MET e por MFA. As imagens topográficas de MFA não mostram diretamente as NP de Au, devido a irregularidade da superfície da GC, comprometendo o uso do MFA nesta análise. A análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) da solução de lisozima mostra aglomerados com dimensões comparáveis com unidades protéicas, sugerindo que não ocorre cristalização antes da deposição na GC. A análise das imagens de difração de elétrons obtidas por MET sugerem que houve formação de cristais de lisozima com parâmetros de rede $a=3,1\text{nm}$, $b= 5,25\text{nm}$ e $c= 8,9 \text{ nm}$. O maior número de cristais tanto na forma monocristalina, quanto policristalina ocorreu nos filmes preparados com NP de Au e com baixas concentrações ($10 \mu\text{M}$) de proteína e menores tempo de incubação.

Palavras-chave: cristalização proteína, lisozima, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica.

Abstract

Lysozyme crystal were prepare on Transmission Electronic Microscope (TEM) Carbon coated grids (CG). Lysozyme is a globular protein that acts as an enzyme hydrolyzing the wall of bacterium, being known as natural antibiotic. The lysozyme solution was deposited on CG by different methods. In addition to the deposition of lysozyme itself, gold nano particles (NP) were also used as nucleant. TEM and Atomic Force Microscopy (AFM) were used to search the formation of crystals. Topographic AFM images cannot show direct evidences of Au NP due to the large irregularity of CG surface, jeopardizing the advantage of AFM. DLS analysis of lysozyme solution shows particles with size compared to the protein unit dimensions, suggesting that crystallization occurs after protein being deposited on CG. TEM images and diffraction patterns suggest the formation of orthorhombic lysozyme crystals with lattice parameters of $a=3.1\text{ nm}$, $b=5.25\text{nm}$ and $c=8.9\text{nm}$. The largest number of crystal, either single or polycrystalline were found for the samples prepared with Au NP and at low lysozyme concentration $10\text{ }\mu\text{M}$ with the shortest incubation time (5 s).

Keywords: crystallization, protein, lysozyme, Transmission Electronic Microscope, Atomic Force Microscopy

Sumário

1. Introdução	01
1.1 Objetivos Geral	03
1.2 Objetivos Específico	03
2. Revisão Bibliográfica	04
2.1 Nanobiotecnologia	04
2.2 Proteínas.....	06
2.3 Lisozima.....	09
2.4 Cristalização de proteína	10
2.5 Interações proteína substrato.....	13
Microscópio de Força Atômica(MFA).....	15
2.7 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL).....	16
2.8 Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).	18
2.8.1 Descrição do MET.....	18
3 Materiais e Métodos	36
3.1 Materiais	36
3.1.1 Grade de cobre revestida com filme fino de carbono bacteriano(GC).....	36
3.1.2 Solução de Lisozima	36
3.1.3 Solução de nano partículas (NP) de Au	37
3.2 Métodos	37
3.2.1 Deposição da lisozima sobre as Grades de Carbono (GC).	37
3.2.2 Deposição de solução de Au 10^{13} NP de Au +lisozima 10uM sobre GC.....	37
3.2.3 Deposição da Lisozima e de NP de Au sobre a GC.....	38
4. Resultados e Discussões	39
4.1Análise e comparações dos resultados obtidos por DLS com as imagens de MET ..39	
4.1.1 Análise de DLS das NP de Lisozima.....	39
4.1.2 Análise de DLS das NP de Au.....	40
4.2 Análises de imagens de MFA	41
4.3 Análises de imagens de MET.....	44
4.4. Análise da Difração.....	51
5. Conclusões.....	64

6. Sugestões para trabalhos futuros	66
7. Referências Bibliográficas	67

1. INTRODUÇÃO

Biomateriais e nanotecnologia [1] são áreas que andam juntas no desenvolvimento de sensores específicos e na compreensão da adesão de proteínas em superfícies sólidas. Proteína, palavra derivada do grego cujo significado é “de primeira importância” é composta de diferentes aminoácidos podendo exercer diferentes funções.

A identificação de monocristais de proteínas aderidos a superfícies sólidas tem dois aspectos importantes: o primeiro é a possibilidade de investigação da cristalização de proteínas pouco solúveis além da eventual economia de tempo no processo de cristalização, o segundo é o desenvolvimento de novos materiais e sensores utilizando as características específicas de determinados processos de adesão e cristalização[1]. A lisozima é uma proteína bastante investigada nos aspectos de adesão em superfícies sólidas e cristalização [2]. Tratando-se de enzima antibacteriana que hidrolisa uma porção da parede celular de algumas bactérias[3], é facilmente disponível e, relativamente simples de cristalizar[3,4]. Proteínas usadas como enzimas são especializadas na catálise de reações biológicas, como é o caso da lisozima, que pode ser usada nos mecanismos de defesa contra bactérias, atuando na ruptura das paredes celulares das mesmas, assim como na produção de derivados de leite agindo como bactericida. Esta proteína enzimática é importante na busca de solução na indústria de alimentos e na produção de medicamentos. As técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia de Força Atômica (MFA) e Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) foram as técnicas básicas utilizadas na caracterização de aspectos nanométricos neste trabalho e serviram para o estabelecimento de rotinas de produção e caracterização de nano e micro cristais de proteína.

A cristalização das macromoléculas de proteínas, normalmente, é difícil e demorada, mas é fundamental para a determinação de suas funções e estrutura [5,6]. O crescimento desses cristais possibilita a descoberta dos mecanismos moleculares para utilização em diagnósticos e tratamento de doenças [5].

A nucleação e crescimento de nano e microcristais, usando o método de filmes finos [6,7], possibilita a utilização de pequenas quantidades de proteína, maior velocidade de investigação da cristalização e o uso de proteínas pouco solúveis. Neste processo as técnicas microscópicas de MET são ferramentas essenciais para a análise de formação de sólidos cristalinos [8] e o MFA é utilizado na investigação dos cristais de

proteína e de outros materiais aderidos à superfície [7], fornecendo informações sobre a topografia de superfície em três dimensões e o acompanhamento das mudanças conformacionais destas biomoléculas [9].

Neste trabalho descrevemos a primeira tentativa de estabelecimento de um método de formação e caracterização de poucas camadas de proteína aderidas sobre Grade de cobre revestida com filme fino de carbono bacteriano (GC), buscando a formação de cristais de lisozima e sua caracterização.

1.1 OBJETIVO GERAL

Preparar e investigar a formação de monocristais de lisozima depositada sobre Grade de cobre revestida com filme fino de carbono bacteriano(GC), incluindo também o uso de nano partículas de ouro.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo para a cristalização rápida da lisozima sobre GC;
- Analisar se as NP de Au agem como nucleante na cristalização;
- Buscar a formação e identificar cristais de lisozima utilizando as técnicas de MFA e o MET;
- Avaliar e comparar qual o método mais eficaz no preparo de camada fina de proteína para obtenção de monocristais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tratando-se de uma dissertação que envolve métodos de diferentes áreas do conhecimento, esta revisão aborda as idéias gerais da tecnologia correlata, seguida de conceitos essenciais envolvendo proteínas, cristalização e interações em superfícies sólidas. As técnicas de microscopia de força atômica e de espalhamento de luz são descritas brevemente. A Microscopia Eletrônica de Transmissão, sendo essencial na caracterização dos monocristais, é tratada com mais detalhes, especialmente nos aspectos da difração de elétrons.

2.1. Nanobiotecnologia

A nanotecnologia trata de manipular estruturas em nanoescala, e quando envolve materiais biológicos torna-se especialmente complexa por demandar conhecimentos específicos de métodos e de técnicas de diversas áreas do conhecimento.

Atualmente novos materiais e nanoestruturas podem ser criados de forma controlada através de métodos físicos e químicos precisos. Pode-se obter assim as propriedades desejadas através da manipulação intencional de suas moléculas, macromoléculas e átomos [10].

Nanopartículas de ouro têm sido usadas para a montagem em nanoescala de cristais de proteínas [11], sendo suas dimensões fundamentais para o sucesso em cada tipo de aplicação [12,13]. A figura 2.2 mostra imagens de microscopia de força atômica e de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas na superfície de micélio fúngico da GC.

O método mais comum de preparo de NP de Au é o conhecido como rota química. No entanto, a rota física, como a técnica de ablação a laser, que foi utilizada na preparação das NP de Au deste trabalho apresenta algumas vantagens [12]. A técnica de ablação por laser consiste em um laser pulsado e um conjunto óptico para focalização do feixe de luz em uma placa de metal imersa em água destilada, não gerando assim outros resíduos. A formação de nanopartículas resulta da nucleação durante o resfriamento seguido pelo crescimento dos núcleos e coalescência como esquematizado na figura 1.1 . [12] Este foi o método adotado pelo grupo de Filmes e Nanopartículas da UFPR que forneceu as NP utilizadas neste trabalho.

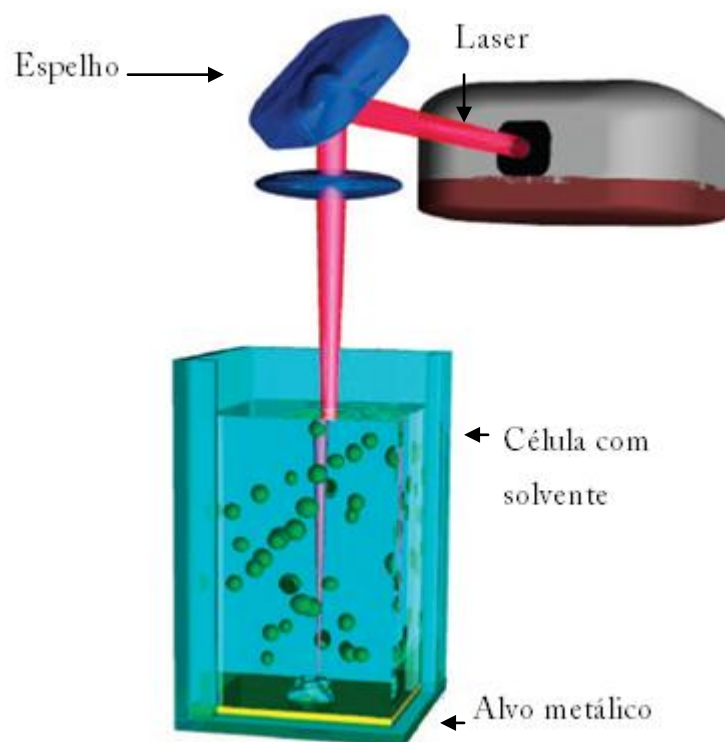


Figura 2.1. Método de Ablação(evaporação do metal) a Laser - Esquemático. [12]

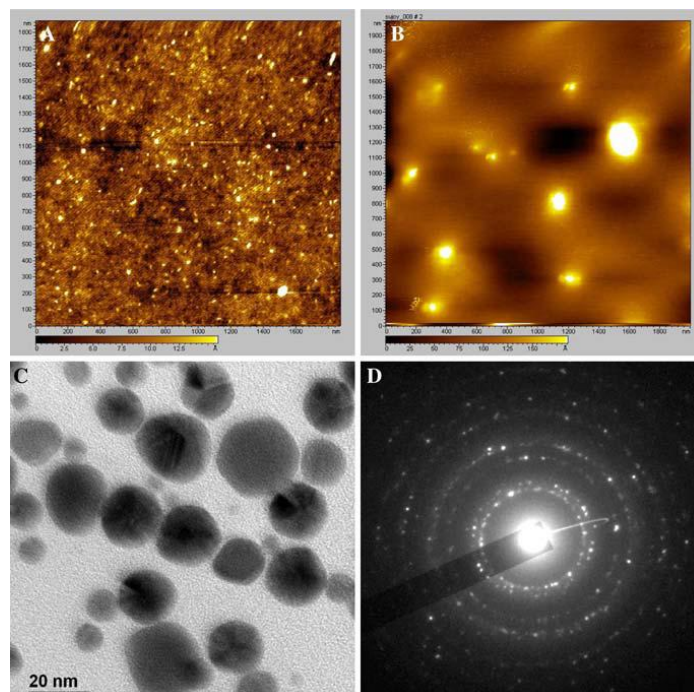


Figura 2.2. Imagem de microscopia de força atômica de nanopartículas de ouro sintetizadas na superfície de micélio fúngico(a-b)baixa resolução(a); b alta resolução(b); imagem de microscopia eletrônica de transmissão (c) padrão de difração(d).[13]

As imagens da figura 2.2 mostram em A e B o aspecto das NP de Au obtidas no MFA, em C o aspecto de NP de Au no MET e em D a imagem de difração das NP de Au, mostrando o caráter policristalino destas.

Desenvolvimentos recentes feitos com o uso de materiais biológicos de arranjo molecular, tem auxiliado o estudo de interações entre superfície-proteína, possibilitando a fabricação de materiais em nanoescala [1].

A funcionalização de superfícies sólidas, cobrindo-as com monocamadas de moléculas orgânicas, é fundamental para o desenvolvimento de sensores, dispositivos moleculares eletrônicos e na montagem de estruturas supramoleculares [14].

2.2 Proteínas

Proteínas são macromoléculas ou polímeros orgânicos, formados por aminoácidos que participam dos processos celulares. Cada aminoácido consiste de um átomo de carbono (chamado de carbono α) ligado a um grupo carboxila (COO^-) (α carboxila) e um grupo amino (NH_3^+) (α amino), estes aminoácidos ligam-se através das conhecidas ligações peptídicas[15]. O grupo α amino de um aminoácido liga quimicamente com o grupo α carboxila de um segundo aminoácido, como mostrado na Fig.3 [15].

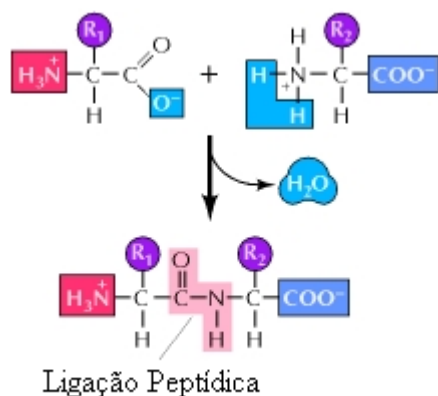


Figura 2.3. O grupo carboxila de um aminoácido é ligado ao grupo amino de um segundo aminoácido por uma ligação peptídica [15].

Toda a variedade de proteínas existentes, deve-se a combinações de 20 tipos de aminoácidos. Alterando-se um aminoácido na cadeia polipeptídica modifica-se as características e a estrutura da proteína. As combinações entre os aminoácidos são

determinadas pelo código genético estabelecendo o papel biológico das proteínas [16].

As proteínas podem se organizar em diferentes formas tridimensionais determinadas pela sequência de seus aminoácidos e resultantes das interações entre estes, existindo quatro níveis de estrutura como mostrado na figura 2.4 estrutura primária, secundária, terciária e quaternária [15, 17].

- 1) Estrutura primária: é formada por uma longa sequência de aminoácidos unidos por meio das ligações peptídicas.
- 2) Estrutura secundária: É dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína, ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos alfa dos aminoácidos e os seus grupos amina e carboxila. Os tipos mais comuns de estrutura secundária são a hélice α , onde pontes de hidrogênio formam, entre CO e NH, grupos de ligações peptídicas, separados por quatro resíduos de aminoácidos e folha β . Em uma folha β , pontes de hidrogênio conectam as duas partes de uma cadeia polipeptídica lado a lado.
- 3) Estrutura terciária: Resulta do enrolamento da cadeia polipeptídica como resultado das interações entre as cadeias laterais de aminoácidos que se encontram em diferentes regiões da sequência primária.
- 4) Estrutura quaternária: consiste na interação entre diferentes cadeias polipeptídicas da proteína.

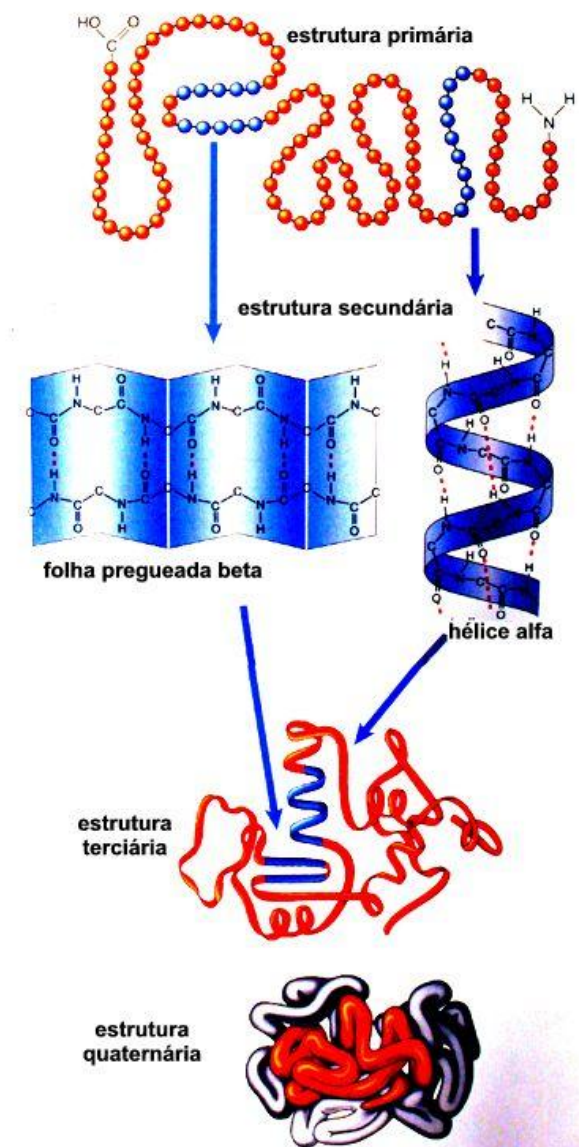


Figura 2.4. Níveis de organização das proteínas [18]

Os substratos ligam-se a uma região específica da proteína (enzima), denominada sítio ativo, a maioria das enzimas apresentam grande especificidade nos substratos que se ligam [19, 17].

A produção de cristais de proteínas é um processo muitas vezes demorado, complicado e dependente de fatores diferentes, mas fundamental para a obtenção da estrutura atômica detalhada dessas macromoléculas biológicas e para a compreensão de sistemas biológicos a nível molecular [3].

2.3. LISOZIMA

A lisozima é uma proteína globular que foi descoberta em 1922 por Alexander Fleming, sendo encontrada em quase toda a vida animal e vegetal [3]. É uma enzima antibacteriana que hidrolisa uma porção da parede celular de algumas bactérias [3,17], sendo conhecida como um antibiótico natural do organismo. Encontra-se em secreções como as lágrimas, a saliva e a mucosa nasal e ainda na clara do ovo, sendo muito utilizada na indústria para controle de bactérias lácteas e no vinho [20].

A estrutura primária da lisozima é formada por uma cadeia polipeptídica de 129 aminoácidos, contendo 4 pares de cisteínas (aminoácido hidrofóbico), ligados a uma ponte dissulfídica unindo pontos distantes da estrutura primária da proteína. A constituição da cadeia da lisozima é do tipo não linear, encontrando-se “dobras” ao longo da cadeia [20].

Lisozima é uma proteína relativamente pequena e estável que pode ser facilmente isolada em grandes quantidades [4]. É facilmente disponível e, relativamente simples de cristalizar e tem sido amplamente estudada com o auxílio de microscopia de força atômica para identificação de aspectos como dimensões, morfologia e mecanismos de crescimento de cristais [3].

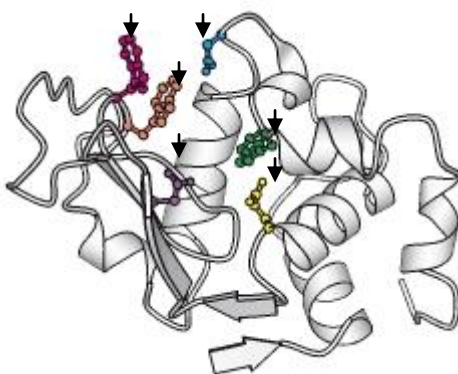


Figura 2.5. Lisozima com vários componentes do sítio ativo mostrado em cores.[15]

A Lisozima é uma enzima que catalisa a redução de cadeias de polissacarídeos nas paredes celulares de bactérias, fazendo que ocorra a ruptura da parede celular e a célula bacteriana estoure. Na figura 2.5, podemos ver indicados por setas, os sítios ativos, isto é, os locais onde as enzimas se unem ao substrato [4,15]. A medida que o substrato e a lisozima se unem, ela induz um movimento de resíduos de aminoácidos podendo fechar-se sobre ele (mecanismo chave-fechadura). Depois que a reação ocorre

a enzima pode se desligar do substrato como evidenciado na figura 2. 6, podendo então participar de outra reação química [4].

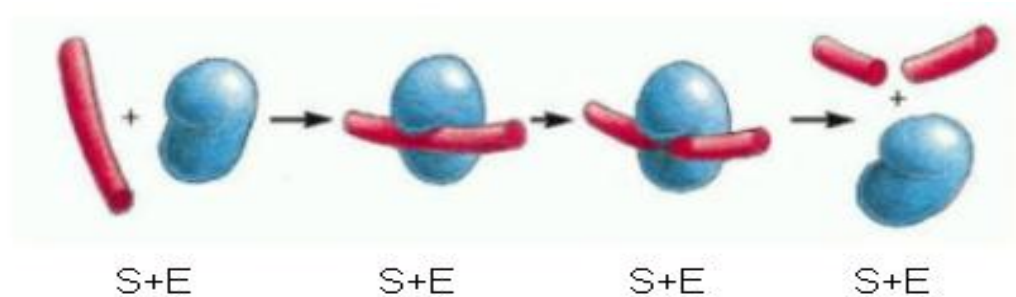


Figura 2.6. A reação catalisada pela lisozima. A enzima lisozima (indicado como E) catalisa a redução de uma cadeia de polissacarídeo, que é seu substrato (S). A primeira enzima se liga à cadeia para formar uma complexo enzima-substrato (ES) e, em seguida, catalisa a quebra do substrato. [4].

2.4 Cristalização de Proteína

Quando as unidades características de um material se organizam periodicamente, formando uma estrutura específica ocorre a cristalização [21].

A nucleação e a cristalização de proteínas depende do comportamento de cada unidade protéica e do meio onde ocorre a cristalização, consistindo de processo complexo em consequência das inúmeras configurações possíveis nas proteínas. Um método que funciona com uma determinada proteína pode ser ineficaz para outra. O processo usual para conseguir-se a cristalização de uma proteína é o método da tentativa e erro [22]. Cada proteína necessita de condições específicas que são difíceis de determinar e por isso a cristalização de proteínas, em geral, ainda é considerada mais arte do que ciência [6].

A partir do crescimento de cristais de proteínas, pode-se determinar suas estruturas tridimensionais em resolução atômica, por meio de métodos de difração, o que nos fornece a base necessária para entendermos melhor as relações estrutura-função da proteína [6]. A partir da análise cristalográfica dos materiais, muitas de suas propriedades podem ser entendidas, possibilitando prever-se funções específicas e até mesmo de projetar novas estruturas com propriedades alteradas [22].

Os cristais de macromoléculas biológicas são frágeis e apresentam um grande conteúdo de solvente. Cristais de macromoléculas biológicas são mantidos por ligações fracas, podendo assim sofrer modificações quando não mantidos em um ambiente adequado[23]. A nucleação e crescimento de nano e microcristais em substratos sólidos, possibilita a utilização de pequenas quantidades de proteína, maior velocidade de investigação da cristalização e o uso de proteínas pouco solúveis [7]. Esse método tem sido utilizado com sucesso em ao menos quatro proteínas diferentes: o citocroma de coelho, citocroma bovino, quinase humana e citocromo bovino recombinante [6]. A figura 2. 7 mostra o aspecto de um nanofilme de citocromo, que é uma proteína de membrana [6].

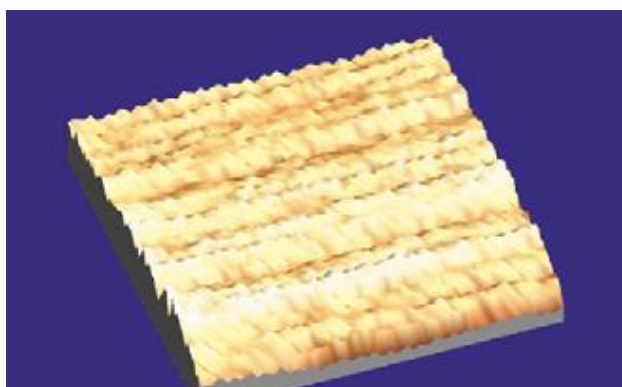


Figura 2.7. Aspecto nanofilme de citocromos, uma proteína de membrana relacionada com a biossíntese de esteróides, determinados por microscopia de força atômica.[6]

A estabilidade e características funcionais das proteínas dependem do pH e da força iônica. Cristais de macromoléculas biológicas devem ser crescidos a partir de soluções aquosas complexas [24].

Quando a solução está supersaturada, isto é, a concentração de soluto é superior a sua solubilidade, as moléculas de soluto começam a fundir-se em agregados de dimensões suficientes para atingir o equilíbrio termodinâmico [3,22].

Existem dois tipos diferentes de nucleação: (1) a nucleação homogênea, que ocorre quando os núcleos são formados no seio da solução, e (2) a nucleação heterogênea, quando os núcleos formam-se preferencialmente em substratos que funcionam como centro de nucleação e do crescimento [22]. As condições para se atingir a nucleação são algumas vezes difíceis de se repetir, e desta forma os procedimentos de sementeação com um material cristalino pré-formado se faz necessário

[24]. O uso de nanopartículas em substratos são objeto de crescente investigação pela grande importância para construção de sensores e em aplicações biomédicas [25]. Os aglomerados formados pelas proteínas são estáveis somente quando chegam a uma dimensão crítica. Aglomerados menores tendem a dissolver quando o tamanho crítico é atingido. O cristal começa a crescer espontaneamente se a solução estiver em estado de supersaturação. Vários aspectos em relação à cristalização vem sendo estudados na busca de nucleantes adequados que diminuam a energia de nucleação. Dentre eles as nanopartículas de ouro que foram testadas como nucleantes com dois tipos de proteínas de modelo muito diferentes, a Hen-lisozima e a ferritina. Concluiu-se que nanopartículas de ouro são nucleantes eficazes para a cristalização dessas proteínas[26]. Após a etapa de nucleação, para que ocorra o crescimento do cristal, a superfície deste deve ser capaz de capturar as unidades de crescimento que chegam da solução e, posteriormente, integrá-los na rede cristalina [3]. A figura 2.8 nos mostra a forma de vários cristais de uma proteína, a GroEL, sob o microscópio de luz. A velocidade da cristalização aumenta com a supersaturação e a nucleação requer um estado de supersaturação maior do que aquele da fase de crescimento. Desta forma a nucleação e o crescimento deveriam ser desacoplados, o que quase nunca é realizado conscientemente.

Uma macromolécula biológica pode cessar seu crescimento cristalino devido aos seguintes fatores não triviais: defeitos de crescimento, contaminação das faces, ou envelhecimento da macromolécula [24].

Até agora, tem sido difícil encontrar a chave para cada proteína existente usando um procedimento geral para cristalização. Cada proteína necessita das suas próprias condições específicas, que são muitas vezes de difícil determinação. Portanto, esta nova abordagem baseada no controle do estágio de formação de nano estruturas foi introduzida, com potenciais aplicações nas ciências da vida e da indústria farmacêutica[7].

A estrutura de um cristal de lisozima tetragonal tem 8 moléculas, uma célula unitária tetragonal, grupo espacial $P4_32_12$ os parâmetros da célula unitária são ($a= 79,1 \text{ \AA}$, $c=37,9 \text{ \AA}$) [27], enquanto a lisozima ortorrômbica tem o grupo espacial $P2_12_12_1$ e os parâmetros da célula unitária ($a=31 \text{ \AA}$, $b= 52,5 \text{ \AA}$ e $c= 89 \text{ \AA}$ [22] .

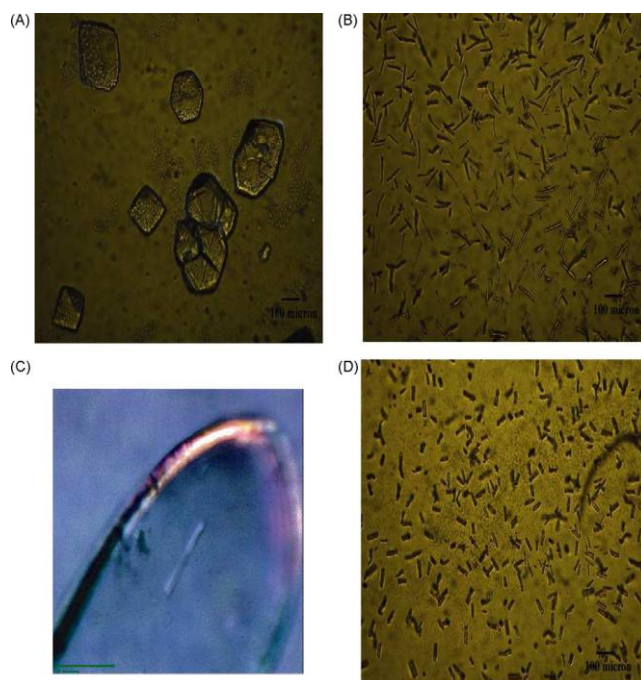


Figura 2.8. cristais (A) GroEL, obtidos por método LB (Langmuir–Blodgett) sob o microscópio de luz (dimensões dos cristais são cerca de $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$), (B) da agulha GroEL microcristais, obtidas por LB método sob o microscópio de luz (cristais de dimensões são cerca de $100\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$); microcristais (C) um da agulha montado no cryoloop, corresponde a $50\mu\text{m}$); cristais (D) GroEL obtido pelo método clássico gota de suspensão (dimensões cristais são cerca $50\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$) [7].

2.5. Interação Proteína Superfície Sólida.

A compreensão da adsorção de proteínas é necessária para controlar a interação entre as proteínas e os sólidos, o que é de fundamental importância no armazenamento de droga, biocompatibilidade de materiais usados em implantes médicos, processamento de alimentos e na construção de biossensores [2].

A funcionalização de superfícies sólidas, cobrindo-as com monocamadas de moléculas orgânicas, tem possibilitado uma revolução nas técnicas de desenvolvimento de sensores moleculares, e na estrutura de montagem de estruturas supramoleculares [14]. Quando uma proteína encontra uma superfície sólida podem ocorrer mudanças conformacionais. Assim a capacidade de adaptar e controlar interações específicas proteína-superfície possibilita novas alternativas em tecnologias de bio-nano-montagem de materiais [1].

As interações superfície-proteína são dependentes das propriedades individuais do sistema, como dos potenciais eletrostáticos na superfície da proteína produzindo melhores interações com proteínas e superfícies [1].

A lisozima é uma proteína com massa molecular de 14kDa¹, ponto isoelétrico em pH 11,1 com superfície positivamente carregada muito estudada nos processos de adsorção[2].

O comportamento da cobertura da superfície pode depender, do modo que a proteína foi introduzida no sistema, da natureza individual da proteína e do tipo de superfície envolvida, o que pode levar a diferentes mudanças conformacionais da superfície[1]. O micro posicionamento das proteínas na superfície com maior precisão e flexibilidade pode possibilitar a fabricação de nanoestruturas em substratos, conseguida através automontagem molecular em superfícies [14].

McPherson introduziu a idéia de que a nucleação para cristalização de proteínas pode ser controlada usando-se substratos minerais como nucleantes, pois, podem diminuir a barreira de energia para a nucleação [22].

A Lisozima, quando exposta diretamente à superfície da mica muscovita, em quantidades suficiente, começa a formar clusters, posteriormente adsorve uma monocamada completa, e eventualmente começa formar multicamadas de proteína adsorvida que sofrem mudanças conformacionais auxiliando na formação de multicamadas que dão origem a agregados na superfície[2].

O preparo de filmes finos biológicos é influenciado pelo pH, concentração de sal, valência de íons, polaridade do solvente e o método de deposição das proteínas [23]. As soluções devem ser preparadas para fornecerem condições estáveis e fisiológicas para interação da proteína na superfície do substrato de modo a não afetar a quantidade de proteína adsorvida. Para isso deve-se ajustar o pH, concentração de proteínas e composição da solução que contém a biomolécula [16].

As propriedades estruturais da proteína também direcionam sua adsorção e a conformação das proteínas na superfície do substrato. Existem proteínas com alta estabilidade interna, que está intimamente relacionada a sua estrutura, e proteínas com baixa estabilidade interna que aderem com mais facilidade em superfícies [23].

¹ Da: É uma medida de massa definida como 1/12 da massa do átomo de Carbono 12 em seu estado fundamental

O método de deposição deve facilitar a fixação e estabilização das proteínas, os métodos mais comuns são: *drop deposition*, que é a deposição direta da quantidade desejada de solução e – *deep coating* –mergulhar o substrato na posição horizontal na solução [16].

A habilidade de controlar a adesão das proteínas e as interações com os substratos desempenham papel fundamental no desenvolvimento de biossensores, biochips, biomateriais e ensaios de desenvolvimento de drogas e diagnósticos [23].

2.6. Microscópio de Força Atômica (MFA)

O MFA é uma importante ferramenta para o estudo de amostras biológicas, pois permite a determinação da topografia destas amostras em alta resolução, inclusive em condições fisiológicas, à temperatura ambiente e sob pressão normal. Pode-se a princípio, por exemplo, monitorar as mudanças conformacionais no estado funcional das proteínas [9], ou mesmo acompanhar em tempo real alguns eventos biológicos [28]. A Microscopia de Força Atômica tem sido utilizado frequentemente para investigar-se como os cristais de proteínas crescem [7,29], observar topografia de superfície e desnaturações das proteínas, além da força de adesão ao substrato [1]. A observação direta da topografia de superfície na escala de nanômetro possibilita a detecção da distribuição espacial da proteína adsorvida em superfícies sólidas [2]. A observação dos estados iniciais de cristalização em um nível quase-molecular, permite identificar mecanismos de nucleação e crescimento dos cristais [3]. No entanto, existem limitações para cada caso investigado, pois a força de interação entre ponta e material investigado determina a construção formação das imagens de MFA.

A técnica de Microscopia de Força Atômica consiste em varrer a superfície da amostra com uma sonda, mantendo a interação ponta-substrato controlada. As forças de superfície mais relevantes para MFA, são as forças atrativas de Van der Waals [3].

A formação de imagem no MFA inicia-se com a escolha do parâmetro de interação desejado. Normalmente em amostras biológicas trabalha-se com a menor interação que permita a obtenção de imagens reprodutíveis e que não danifiquem o material estudado. Os modos de operação mais comuns são: o modo contato e o modo dinâmico. É importante esclarecer o que se entende por contato quando dois átomos

neutros estiverem suficientemente próximos, que é o caso das forças de Van der Waals. Inicialmente ocorrerá uma crescente força de atração até que a proximidade seja suficiente para que a força eletrostática repulsiva passe a dominar. Assim, entende-se como modo contato em MFA a condição de trabalho onde a interação repulsiva é estabelecida.

No modo contato o parâmetro de controle é estabelecido pela deflexão do cantilever enquanto que no modo dinâmico fixa-se um intervalo de variação na frequência e na amplitude de ressonância do cantilever. Em ambos os casos o sistema opera procurando manter a interação constante (força constante) , porém há casos onde a distância constante é a melhor opção, sendo esta conversão entre força constante e distância constante estabelecido com base na calibração do “cantilever”. Alterações na frequência de ressonância são sempre detectadas com mais sensibilidade do que a deflexão do “cantilever”. Assim, o modo dinâmico permite um melhor controle para minimização das interações com a amostra e foi o mais utilizado neste trabalho. Os equipamento utilizado neste trabalho foi um AFM-Shimadzu 9500F3 com cantilevers Nanosensors (42 N/m) e operando em modo dinâmico.

2.7. Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)

Devido à sensibilidade da proteína, técnicas de caracterização invasivas podem constituir um problema, a técnica de espalhamento de luz é uma técnica não invasiva que tem recebido ampla aceitação [30]. O princípio de funcionamento do EDL consiste em atravessar-se a amostra por um feixe de laser e detectando-se as flutuações da luz espalhada. As flutuações da luz espalhada revelam informações sobre as dimensões das partículas em suspensão dentro de um líquido.[31]

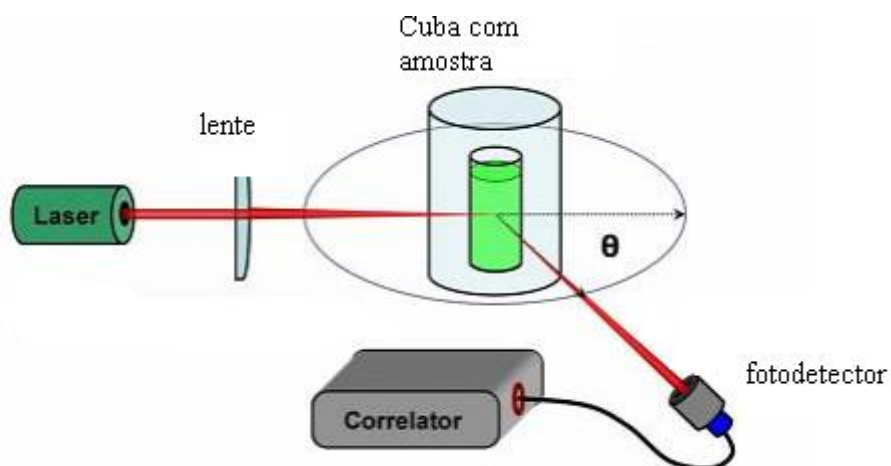


Figura 2.9 Desenho Esquemático da Técnica de EDL.

O movimento browniano dessas partículas, devido ao bombardeamento das moléculas de solvente que as cercam, será tanto maior quanto menor forem as partículas em suspensão [30]. Estas partículas em suspensão também causam mudanças no índice de refração da luz, gerando variações de intensidade da luz espalhada, possibilitando a determinação do tamanho das partículas[32] e informações sobre o comportamento da proteína em solução, não causando danos a amostra e possibilitando a utilização de quantidades mínimas de solução [33]. Devido à pequena diferença do índice de refração das proteínas em relação ao solvente a determinação das dimensões de nanopartículas de proteínas é bem menos sensível do que aquela para materiais metálicos como os metais ou seus óxidos.

Na medida de Espalhamento Dinâmico de Luz, as dimensões das partículas são calculadas a partir do coeficiente de difusão e medido através da equação de Stokes-Einstein, onde é admitido um modelo de esferas rígidas como evidenciado na figura 2.10.

$$D = k_B \cdot T / 6\pi\eta a$$

Sendo a = raio das esferas, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em graus Kelvin e η é a viscosidade do solvente [34].

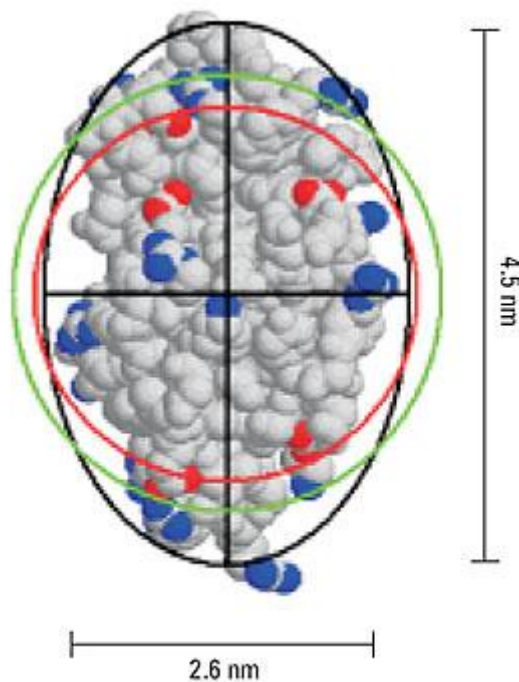


Figura 2.10. Representação da estrutura de um cristal de lisozima, mostrando as dimensões geométricas axial, o diâmetro da esfera rígida (vermelho) para a proteína de 14,7 kDa (volume específico = 0,73 g / mL), o diâmetro hidrodinâmico (verde) calculado a partir do coeficiente de difusão, e um elipsóide com as mesmas propriedades da proteína (preto) [34].

2.8. Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET)

2.8.1. Descrição do MET

A obtenção de imagens e de padrões de difração na microscopia eletrônica é importante para a investigação de materiais cristalinos, sendo especialmente útil para identificar morfologia, estruturas e orientação dos cristais com dimensões reduzidas e em interfaces [27, 35].

Um MET consiste de um feixe de elétrons, gerados por emissão termiônica, a partir de um filamento geralmente de tungstênio e acelerados por potencial elétrico [36]. Um conjunto de lentes eletromagnéticas encerradas em uma coluna mantida em vácuo, cerca de 10^{-5} mm Hg, controla o feixe [36,37,38]. Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas pela capacidade de espalhamento e absorção dos elétrons. O contraste nas imagens será definido pelas características eletrônicas de cada átomo, pela espessura e pelas leis de

difração impostas pelo arranjo cristalino [37]. Em materiais orgânicos em geral opera-se com energias na faixa de 60 a 80 keV [37].

O MET é fundamental para comparações mais confiáveis de pequenas estruturas de proteínas, pois pode fornecer resolução lateral que chega a 0,3-1,0 nm, mostrando com detalhes estruturas biológicas, permitindo determinar a base molecular para atividades funcionais, interações e mudanças estruturais [39]. A principal vantagem do uso do MET comparado a fontes convencionais de Raios-X é a facilidade e versatilidade de focalização e seleção de áreas pequenas. Uma segunda vantagem da MET é a menor energia depositada nas amostras, que por causa da natureza do espalhamento de elétrons, pode depositar pelo menos três ordens de magnitude menos energia na amostra em comparação com raios-X [22]. A partir de meados da década de 80 o MET tornou-se um dos principais recursos de microscopia eletrônica para o estudo de cristais de importância farmacêutica e biológica [40].

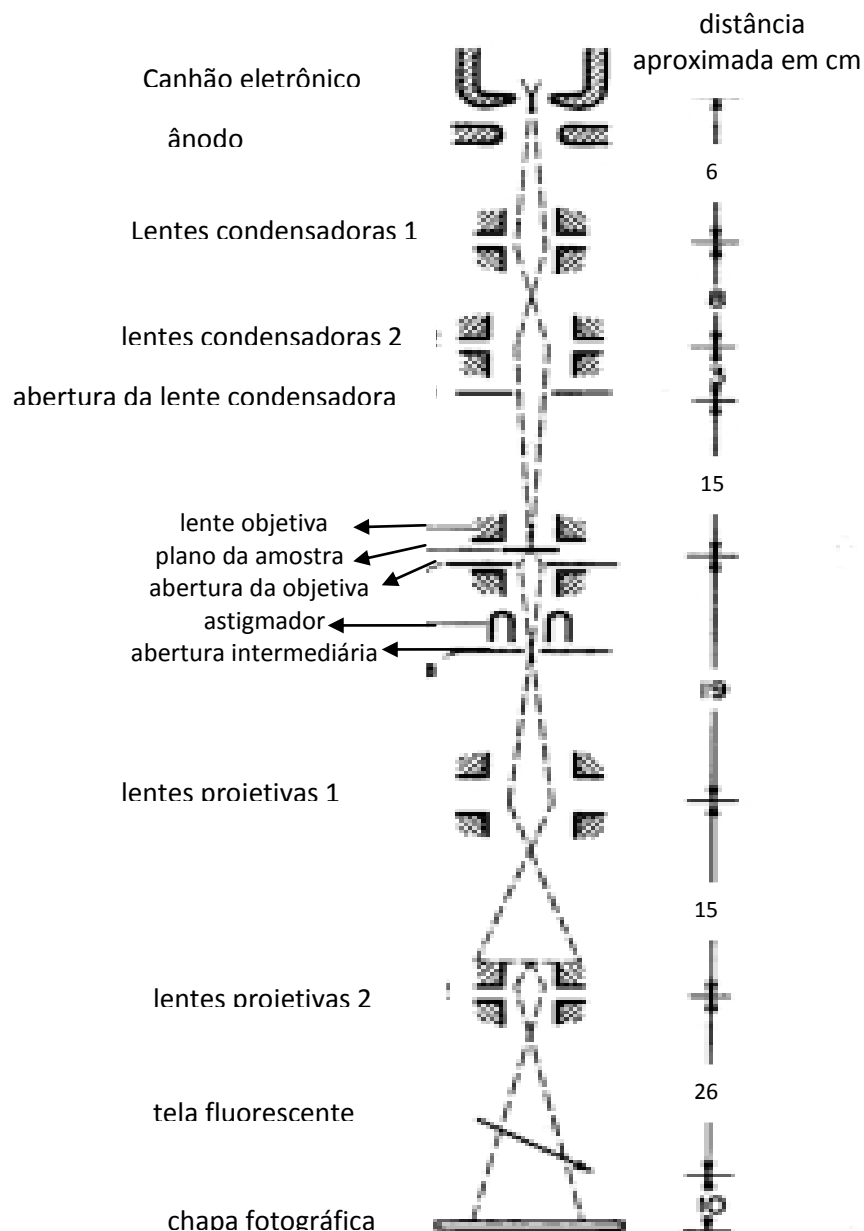


Figura 2.11. Desenho do MET (esquemático)[37].

MECANISMO DE FORMAÇÃO DA IMAGEM

As amostras para microscopia eletrônica de transmissão devem ser tão finas que possam ser atravessadas pelos elétrons. O espalhamento durante a passagem dos elétrons através da amostra podem ser elástico, que ocorre sem perda de energia (ou difração) e espalhamento inelástico, que ocorre com perda de energia. Quanto maior o número atômico do centro espalhador maior será a capacidade de espalhamento dos átomos e menor a espessura que será atravessada.

Como regra geral, as amostras a serem analisadas pelo MET devem ter poucos nanômetros de espessura e preparadas sobre grade de aproximadamente de 3,0 mm de diâmetro, como mostrado na figura 2.12. Os materiais usuais das grades são cobre, molibdênio, ouro e platina, podendo ser recobertos com filmes finos de Carbono [36] .

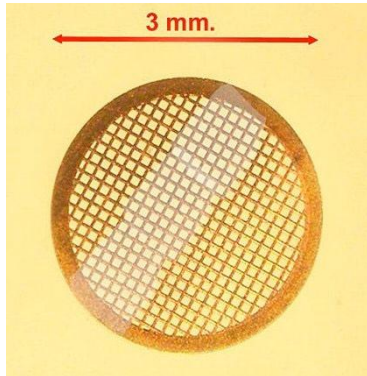


Figura 2.12. Grade de cobre “mesh” 300 carbon coated-E.M.S. para MET [36].

No caso de um monocristal, a difração produz imagens que consistem num padrão de pontos como mostrado na figura 2.13 (a) , enquanto que para policristais a imagem de difração consiste em uma série de anéis, como mostrado na figura 2.13 (b) e em um material amorfo como os elétrons espalham-se em todas as direções a imagem consiste em um anel largo, como mostrado na figura 2.13 (c) [37].

Georgieva [22] investigou o potencial de difração de elétrons de nanocristais de lisozima e de alguns produtos farmacêuticos.

e um material amorfo [37].

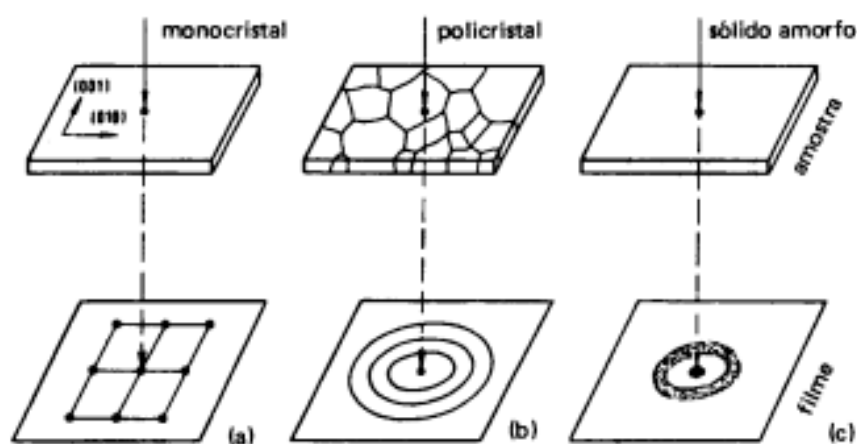


Figura 2.13. Tipos característicos de figuras de difração:

- a) região monocristalina;
- b) região policristalina;
- c) região amorfa[37]

O contraste nas imagens formadas em MET tem origens da diferença de espessura, diferença de densidade ou de coeficiente de absorção, da difração e campos elásticos de tensão. Para sólidos cristalinos a transparência a elétrons depende criticamente das condições de difração que diferem bastante conforme a direção. Quando um feixe de elétrons passa por uma lâmina de material cristalino, somente aqueles planos quase paralelos ao feixe incidente contribuem para a figura de difração [37].

A utilização do MET no modo conhecido como área selecionada, possibilita o estudo de micro regiões da ordem de 1 μm onde o diagrama de difração de um cristal corresponde aproximadamente a uma secção plana através do espaço recíproco, perpendicular ao feixe incidente [37].

Quando elétrons atravessam uma amostra amorfa estes são espalhados igualmente em todas as direções. A formação do largo anel mostrado na figura 2.13c evidencia esta independência da direção. Neste caso não ocorre espalhamento elástico ou coerente e as características do anel difuso são associadas com a distância média entre os átomos.

Devido ao arranjo periódico de átomos na rede cristalina, diferenças de caminho originam diferenças de fase entre as ondas secundárias. Se a diferença de fase é igual a um número inteiro de comprimento de onda, tem-se a máxima interferência construtiva possível, o que é a condição para a difração (condição de Bragg). Podemos observar na figura 2.14. o caminho do feixe eletrônico, para uma amostra cristalina.

Merece destaque a possibilidade da microscopia eletrônica trabalhar com áreas selecionadas de dimensões típicas que variam de meio micrometro a alguns micrometros, referida em inglês como a técnica de SAD (Selected Area Diffraction).

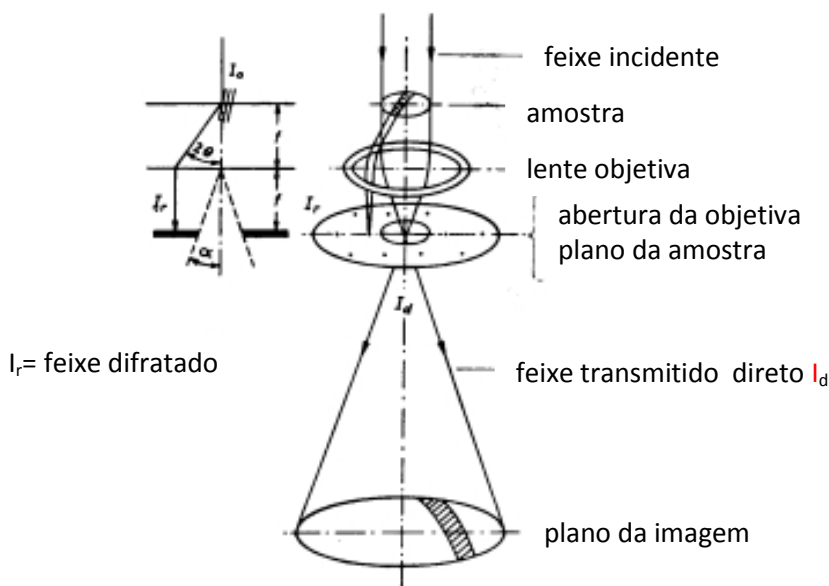


Figura 2. 14. Formação de imagem de material cristalino, bloqueando-se o feixe difratado para melhor resolução e contraste da imagem de interesse. (esquemático)[37].

Os feixes difratados a um ângulo 2θ , são focalizados pela lente objetiva em um ponto de difração, no seu plano focal , formando um padrão de difração.

Utilizou-se neste experimento um MET- JEOL modelo 1200EXII de 120 kV.

Aspectos conceituais necessários ao entendimento do fenômeno da difração.

- CÉLULA UNITÁRIA

Os materiais sólidos cristalinos são construídos a partir da repetição de um elemento (átomo ou conjunto de átomos) no espaço. A figura 2.15 representa um cristal de NaCl (sal de cozinha) composto dos átomos de Sódio (Na) e de Cloro (Cl). A figura 2.16 representa a célula unitária de uma estrutura ortorrômbica. Escolhendo-se a menor porção da rede de pontos que transladada permitirá a construção da própria rede (um cristal macroscópico), esta porção chama-se de célula unitária da rede cristalina [41].

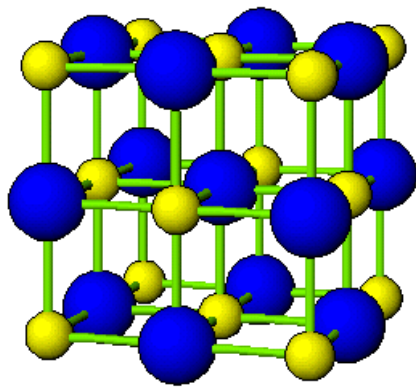


Figura 2.15: Célula unitária do NaCl[41].

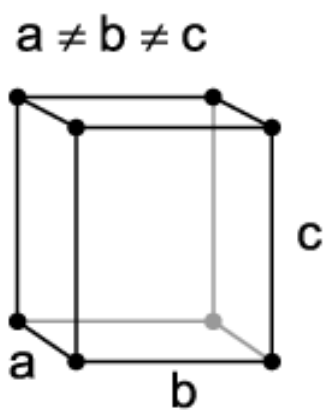


Figura 2.16: Célula unitária de uma estrutura ortorrômbica.[41], onde cada ponto pode corresponder a milhares de átomos agrupados como ilustrado na figura 2.17

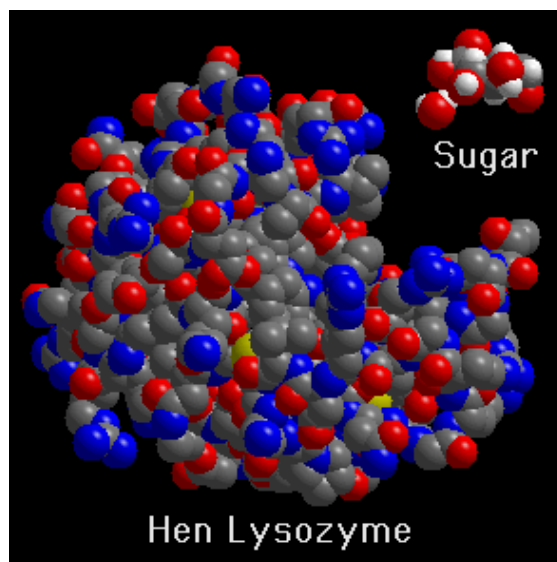


Figura 2.17. Macromolécula de Lisozima comparada com açúcar.[42]

Na figura 2.17, mostra-se a comparação da complexidade da unidade protéica da Lisozima com uma molécula de açúcar. Na rede de pontos com estrutura ortorrômbica a , b , c (figura 2.16), cada ponto estará associado às centenas de átomos que constituem a macromolécula de lisozima.

O comprimento das arestas de uma célula unitária e a medida dos ângulos de suas faces, representados na figura 2.18 nos fornece os parâmetros de rede do cristal, indicando o sistema cristalino.[41]

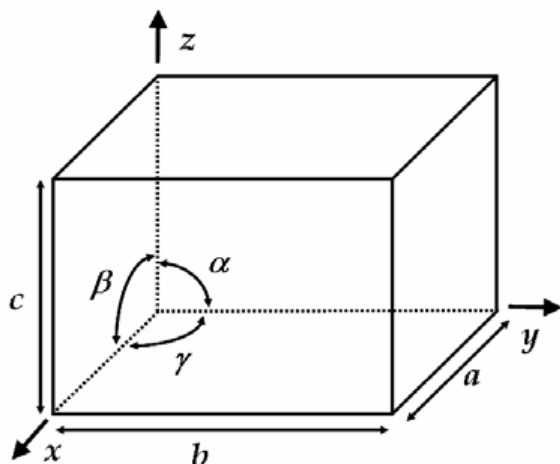


Figura 2.18. Representação dos parâmetros de uma cela unitária.[41]

Deve-se notar ainda que um cristal é definido primeiramente pela simetria de seus pontos na rede, mas também pelas posições relativas de seus átomos.

Qualquer material sólido cristalino pode ser construído a partir de sete tipos diferentes de simetria para células unitárias: cúbica, tetragonal, ortorrômbica, romboédrica (ou trigonal), hexagonal, monoclínica e triclínica, adicionados das posições dos átomos que compõe o sólido, como mostrado na tabela 2.1, esses 7 tipos de simetria podem gerar 14 tipos diferentes de estruturas denominadas redes de Bravais como mostrado na tabela 2.2. Existem seis parâmetros de rede que definem a célula unitária, ou seja: a , b e c indicam o comprimento dos três eixos, enquanto α , β e γ são os três ângulos existentes nos vértice da célula [43].

Tabela 2.1. Relação entre os 7 tipos de simetria e os parâmetros de célula unitária[43].

Sistema	Parâmetros de rede
Cúbico	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômbico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Romboédrico	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ ; \gamma \neq 120^\circ$
Monoclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
Triclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

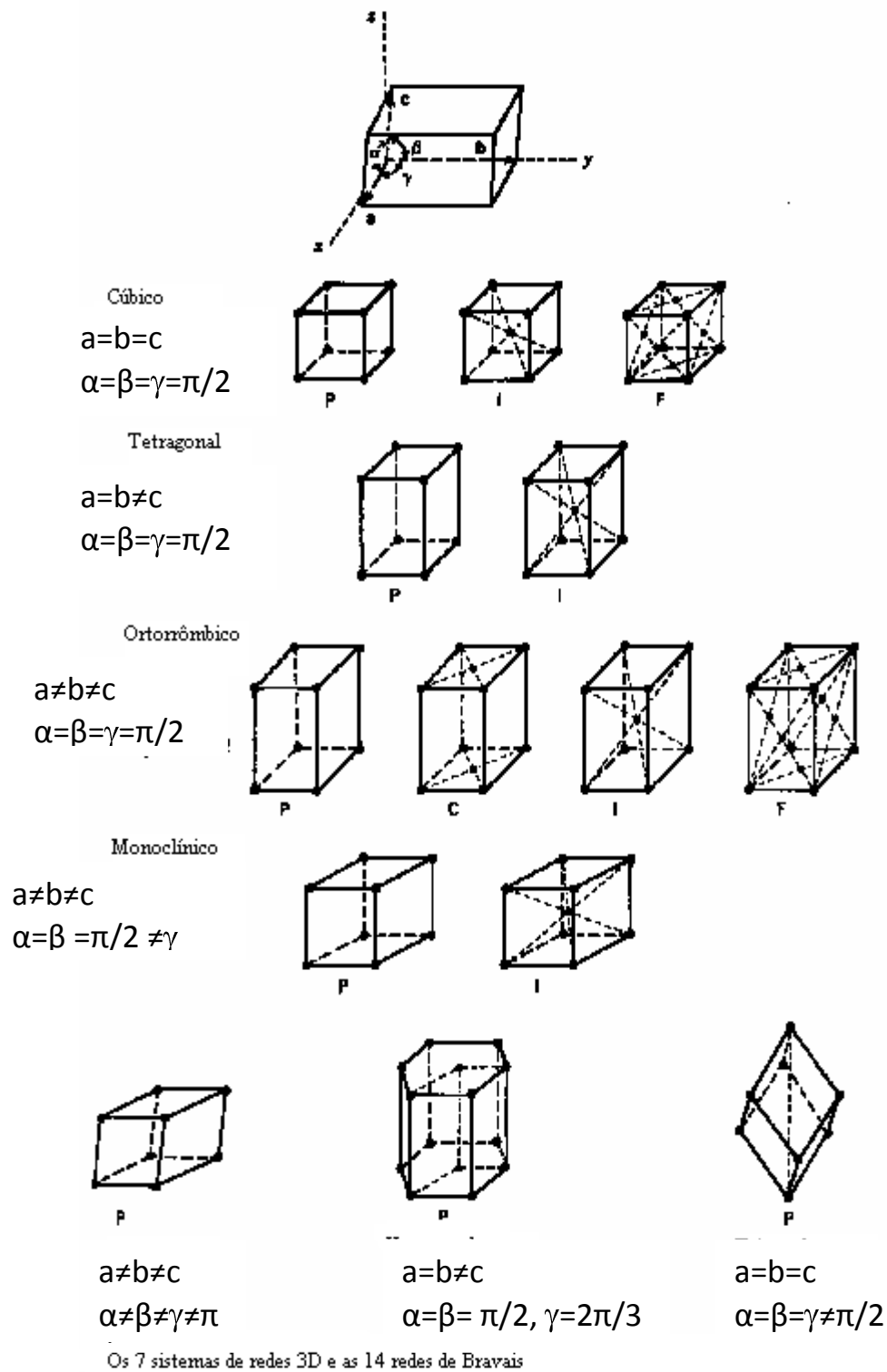


Figura 2.19. Redes de Bravais [43]

- ÍNDICES DE MILLER

Num retículo cristalino, o conjunto de planos paralelos que difratam podem ser representados pelos índices de Miller (hkl).

Para determinação dos índices de Miller: a partir de um retículo cristalino o conjunto de planos paralelos pode ser representado por um conjunto de números inteiros, assim determinados:

1. Encontre a intersecção do plano de interesse com os eixos da rede.
2. Expresse estas intersecções em unidades de cada parâmetro de rede e ache o inverso, assim: 1 d (parâmetro de rede) equivalerá a 1 e $\frac{1}{2}$ d corresponderá a 2.

Estes números inteiros serão os índices de Miller dos planos paralelos. Os índices de Miller são normalmente denominados pelas letras h, k, l e a direção no espaço perpendicular aos planos $(1,0,0)$ será representada por $[1,0,0]$ que corresponde a notação vetorial $1\hat{i} + 0\hat{j} + 0\hat{k}$ para os casos das redes cúbicas [36]. É importante lembrar que para um sistema ortorrômbico é necessário definir-se uma escala comum para o cálculo de ângulos entre os planos (h,k,l) . Assim, costuma-se tomar como referência o parâmetro b , determinando-se as relações a/b , b/b e c/b como parâmetros de referência.

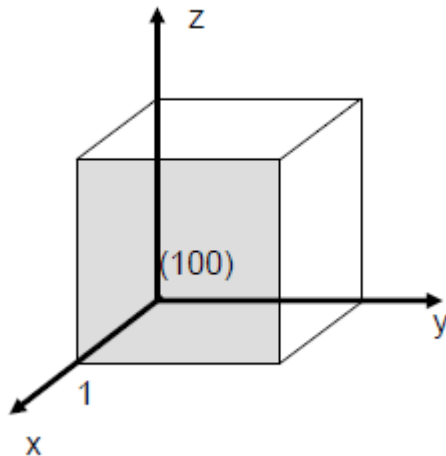


Figura 2.20. O plano ilustrado na fig. 2. 20 intercepta o eixo x na posição 1, é paralelo aos eixos y e z , então os índices de Miller serão $h = 1$, $k = 0$ e $l = 0$ [44].

No segundo exemplo mostrado na figura 2.21, o plano corta o eixo x em 1 e o eixo y em -1, sendo paralelo a z , então os índices de Miller são $[1 -1 0]$.

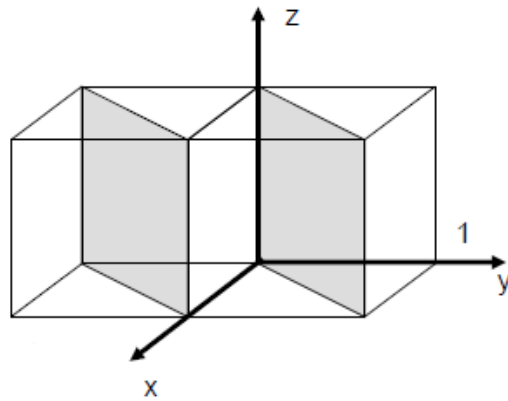


Figura 2.21. O plano ilustrado na fig.2.21 intercepta o eixo x na posição 1, o eixo y na posição -1, e é paralelo ao eixo z, então os índices de Miller serão $h = 1$, $k = -1$ e $l = 0$ [44]

- DIFRAÇÃO

A difração ocorre quando uma onda encontra um ou mais obstáculos. Se estes obstáculos estiverem regularmente espaçados por distâncias comparáveis ao comprimento da onda incidente, e em grande número teremos interferência construtiva ou destrutiva em regiões bem separadas e definidas [24, 45]. Considerando que os materiais sólidos cristalinos podem ser representados por arranjos de pontos regularmente distribuídos em 3 dimensões do espaço, a periodicidade do cristal faz com que existam planos separados por distâncias fixas (d_{hkl}) em diferentes direções (θ_{hkl}).

A relação entre estrutura cristalina e a condição para ocorrer difração é definida pela equação 1, conhecida como lei de Bragg [21, 24, 45]:

$$n\lambda = 2 d_{hkl} \sin\theta_{hkl} \quad (2.1)$$

onde, $n\lambda$ = número inteiro de comprimento de onda, d_{hkl} = distância interplanar e θ_{hkl} = ângulo de Bragg.

Quando uma frente de onda incide sobre um cristal, esta é espalhada em todas as direções, pelos elétrons associados a cada átomo encontrado no caminho do feixe. Considerando 2 planos paralelos com o mesmo índice de Miller (h,k,l), estes estarão separados por uma distância d_{hkl} , como mostra a figura 2.22. Para que ocorra interferência construtiva, as ondas espalhadas por átomos P e Q devem percorrer distâncias que diferem de número inteiro n (ordem de reflexão) de comprimentos de onda.

$$n\lambda = SQ + QT \quad (2.2)$$

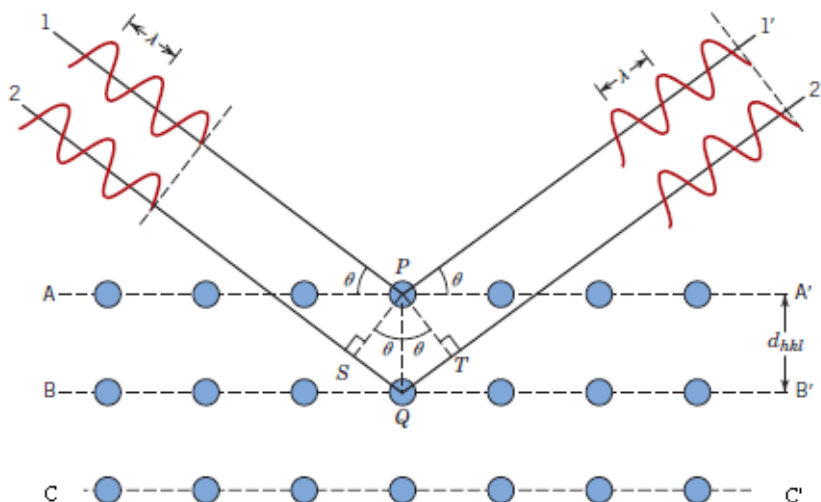


Figura 2.22. Relação entre comprimento de onda, espaçamento interplanar e ângulo de difração para interferência construtiva [45].

Sendo d_{hkl} o espaçamento interplanar dos planos com mesmo (h,k,l). O segmento AB é igual a BC e temos:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \text{ (Lei de Bragg)}$$

onde λ é o comprimento de onda, θ é o ângulo que o vetor de onda incidente faz com o plano de difração e n é um inteiro [45, 46].

A intensidade dos pontos de difração pode ser calculada considerando-se a posição de cada átomo, suas características como centro espalhador e a distribuição geométrica dos átomos. No caso de proteínas este é um cálculo difícil e no caso de cristais pequenos onde algumas orientações são privilegiadas torna-se impraticável o cálculo de intensidades destes pontos. No entanto, o fato de existir uma distribuição que reflete a simetria do cristal e que mantém as relações geométricas da estrutura considerada, garante certa segurança em podermos afirmar que os resultados correspondem a uma estrutura cristalográfica definida.

DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS

A difração de elétrons ocorre em ângulos muito pequenos, consequência do pequeno comprimento de onda do elétron ($\lambda=0,0043\text{nm}$ para 80 keV). Por isso os

planos difratantes são quase paralelos ao feixe primário. Como o ângulo de difração é pequeno, a função $\sin\theta$ na lei de Bragg, pode ser substituída por θ em radianos.

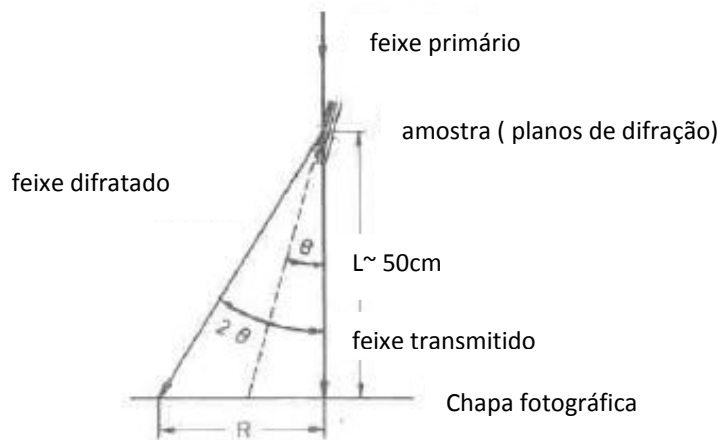


Figura 2.23. Desenho da difração evidenciando o ângulo de Bragg.[37]

A figura 2.23 mostra uma seção longitudinal contendo um feixe primário, o feixe difratado, a amostra, a tela da imagem e o ângulo de Bragg em tamanho exagerado e o ângulo difratante 2θ . L é a distância entre a amostra e a placa fotográfica (comprimento de câmara) e R é a distância sobre a placa, entre o feixe direto transmitido e um ponto de difração.

Analisando a figura 2.23 vemos que:

$$\tan\theta = R/2L \quad (2.3)$$

Como temos um valor muito pequeno para θ , segue-se que

$$\theta = R/2L \quad (2.4)$$

Então podemos reformular a Lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta = 2d\theta = 2dR/2L \quad (2.5)$$

$$\text{Se } n=1, \text{ temos } \lambda L = R \cdot d \quad (2.6)$$

Calibrando-se com Au a cte de câmara obtida foi $\lambda L = 2,56 \pm 0,05 \text{ nm.mm}$.

ESPAÇO RECÍPROCO

Espaço recíproco é um recurso matemático criado para auxiliar na interpretação do processo de difração, podendo ser definido como um conjunto de pontos, cada um determinado considerando-se as normais a todos os planos (h,k,l) saindo de um ponto 0,

considerado como origem, onde as normais se encontram, a uma distância $1/d_{hkl}$, este conjunto de pontos formam o espaço recíproco(figura 2.23)[44].

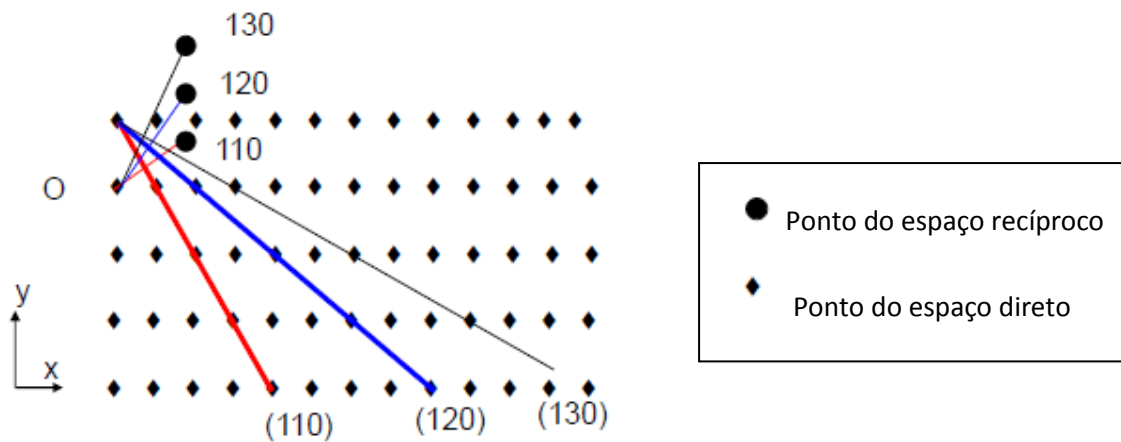


Figura 2.24. Representação dos planos (110), (120) e (130) considerando-se uma origem arbitrária, indicada por O traça-se um vetor perpendicular aos planos com tamanho $1/d_{hkl}$, assim temos os pontos do espaço recíproco no final desse vetor [44].

Assim para cada família de planos paralelos do espaço direto temos uma correspondência com pontos do espaço recíproco.

ESFERA DE EWALD

A esfera de Ewald é um ente geométrico 3D que permite facilitar a visualização das condições de difração e também possibilita a visualização da difração no espaço real e no espaço recíproco. Toda vez que um ponto do espaço recíproco cruza a esfera de Ewald ocorre um ponto de difração. A figura 2.25 mostra a esfera de Ewald e a produção de um ponto de difração representado por P e demonstra que ao girarmos o cristal, giramos o retículo recíproco trazendo novos pontos para a condição de difração como o ponto P'[44].

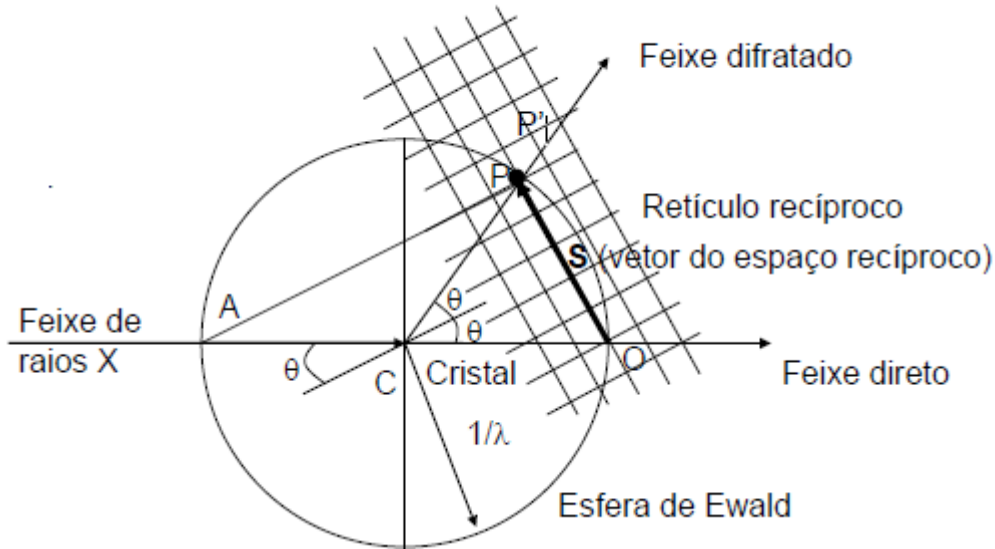


Figura 2.25. Esfera de Ewald [44].

A partir da análise da figura 2.25, podemos determinar a relação entre o ângulo (θ), d e o comprimento de onda (λ), considerando o triângulo APO, temos que PAO é o ângulo (θ) e assim temos:

$$\text{sen}(\theta) = \frac{s}{2\lambda} \quad (2.7)$$

Como P é um ponto do espaço recíproco, assim seu comprimento de onda será $1/d_{hkl}$, onde hkl são os índices de Miller dos planos relacionados com P. Assim temos

$$\text{sen}(\theta) = \frac{s}{2\lambda} = \frac{\frac{1}{d_{hkl}}}{2\lambda} \quad (2.8)$$

Ou seja $2d \cdot \text{sen}(\theta) = \lambda$ que é a Lei de Bragg que expressa a condição para haver a difração.

Ao girarmos o cristal, e consequentemente o retículo recíproco, podemos varrer uma ampla região do espaço recíproco, evidenciando todos os pontos que estão em condição de difração, ou seja cruzando a esfera de Ewald, esses pontos podem ser determinados a partir de uma esfera denominada esfera limite, figura 2. 26. Girar o retículo recíproco é equivalente a girarmos a esfera de Ewald, que gera então uma esfera limite de com raio $2/\lambda$.

Os pontos do espaço recíproco dentro do volume da esfera limite podem ser trazidos em condição de difração. O número total de pontos que pode-se associar com

difração é determinado dividindo-se o volume da esfera limite pelo volume da célula unitária recíproca, considerando-se que a célula unitária é primitiva.[44]

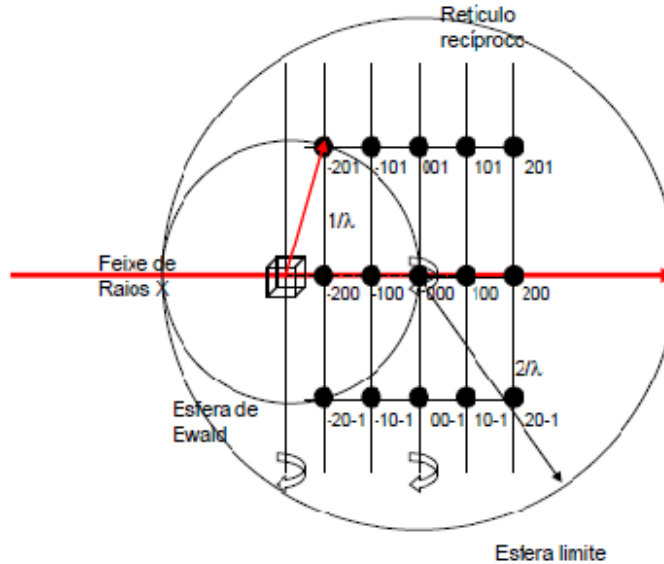


Figura 2.26: Esfera Limite [44]

Seja N o número de reflexões potencialmente gerados para uma esfera limite de raio $2/\lambda$ temos:

$$N = \frac{V_{\text{esfera limite}}}{V^*} \quad (2.9)$$

$$N = \frac{4/3 \pi (2/\lambda)^3}{V^*} \quad (2.10)$$

Sabendo que $V^* = 1/V_{\text{cel}}$, onde V_{cel} é o volume da célula unitária teremos:

$$N = \frac{32 \pi V_{\text{cell}}}{3 \lambda^3} \quad (2.11)$$

Conhecendo-se os parâmetros da célula unitária e os índices de Miller(hkl) associados aos planos cristalográficos responsáveis pela difração é possível calcular a distância interplanar, d_{hkl} utilizando as equações:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad \text{Para simetria tetragonal} \quad (2.12)$$

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{k^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$$

Para simetria Ortorrômbica (2.13)

Determinando as distâncias interplanares podemos compará-las com os valores experimentais calculados usando-se, p.e., o programa ImageJ para medir as distâncias diretamente nas imagens obtidas por MET.

A partir da determinação dos índices de Miller podemos determinar também os ângulos entre planos do cristal usando a equação:

$$\cos\theta_{ij} = \frac{h_i \cdot h_j + k_i \cdot k_j + l_i \cdot l_j}{\sqrt{h_i^2 + k_i^2 + l_i^2} \cdot \sqrt{h_j^2 + k_j^2 + l_j^2}}$$

(2.14)

Os índices i,j referem-se a quaisquer pares de planos. A distribuição angular dos possíveis ângulos entre planos, pode ser calculada para qualquer cristal específico e obtida na projeção estereográfica. Os valores das distâncias interatômicas e ângulos entre planos observados experimentalmente, podem ser comparados com os valores calculados e assim os pontos de difração são indexados.

Equipamentos utilizados.

O microscópio eletrônico de transmissão (MET). Utilizou-se um JEM 1200EXII Electron Microscope (600milX), JEOL que alcança 120 keV, operando em 80 keV e comprimento de câmera L = 600 mm.

O microscópio de força atômica (AFM) foi o Shimadzu modelo SPM9500J3, em modo dinâmico com “cantilever” nanosensor de 42 N/m e raio de curvatura de 10 nm.

O equipamento de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizado foi um Nanotrac NP253 da empresa Microtrac (www.microtrac.com) disponível no LANCEN-UFPR., que permite a detecção de partículas com dimensões entre 0,8 até 6500 nm.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Grade de cobre revestida com filme fino de carbono bacteriano(GC)

Para MET foram utilizadas grades de cobre da Electron Microscopy Sciences “mesh” 300 revestidas com carbono bacteriano (carbono coated).

3.1.2 Solução estoque de Lisozima

A lisozima utilizada foi a da clara do ovo (Sigma), diluída em água miliQ para concentrações de 10 mM e 10 μ M, com as especificações abaixo:

Lisozima da clara do ovo de galinha L86876-pó liofilizado, proteína 90% 040 mil unidades/MG de proteínas.

Características da lisozima: Peso molecular de 14,3 kDa, na forma de pó dialisado e liofilizado, contendo sais de buffer como acetato de sódio e cloreto de sódio, com pelo menos 90% de proteína[47].

Características dos sais:

CLORETO DE SÓDIO(NaCl): Sistema cristalino cúbico de face centrada com parâmetros de célula unitária $a=5,64\text{\AA}$ ACETATO DE SÓDIO (CH_3COONa): O acetato de sódio cristaliza sob duas formas

Forma I: ortorrômbica com parâmetros de célula unitária $a=17,850\text{\AA}$ $b= 9,982\text{\AA}$, $c=6,068\text{\AA}$

Forma II; ortorrômbica com parâmetros de célula unitária $a=5,952\text{\AA}$, $b=20,213\text{\AA}$, $c= 5,902\text{\AA}$ [48].

3.1.3 Solução de nano partículas (NP) de Au

As NP de ouro foram preparadas pelo método de ablação a laser em solução, resultando em 10^{18} NP/ml com NP esféricas com diâmetro médio de aproximadamente 14 nm.

3.2 Métodos. Os métodos de análise foram detalhados na secção 2.6; 2.7 e 2.8.

Equipamentos de análise.

O microscópio eletrônico de transmissão (MET). Utilizou-se um JEM 1200EXII Electron Microscope (600milX), JEOL que alcança 120 keV, operando em 80 keV e comprimento de câmara $L = 600$ mm (ver Apêndice página 70).

O microscópio de força atômica (AFM) foi o Shimadzu modelo SPM9500J3, em modo dinâmico com “cantilever” nanosensor de 42 N/m e raio de curvatura de 10 nm.

O equipamento de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizado foi um Nanotracs NP253 da empresa Microtrac (www.microtrac.com) disponível no LANCEN-UFPR., que permite a detecção de partículas com dimensões entre 0,8 até 6500 nm.

3.2.1 Deposição da lisozima sobre (GC).

Nesta etapa foram utilizados 2 métodos de deposição da lisozima na GC: o método da “gota”, ilustrados nas figuras 26 e o método “*drop deposition*”, ilustrado na figura 27. O método da “gota” consiste em depositar uma gota de solução sobre papel parafinado, e logo em seguida, colocar a GC sobre a gota aguardando um tempo de incubação.

As soluções de lisozima a 10mM e a 10 μ M, foram depositadas sobre GC por “*drop deposition*” usando-se uma alíquota de 15ul. A gota do método da “gota” tinha volume de 30ul, e os tempos de incubação utilizados foram de 5 e 10s. Após o preparo algumas amostras foram “lavadas”, passando-se a GC em uma gota de 30ul de água miliQ, em seguida o excesso de material foi retirado com papel absorvente pelas bordas da GC, conforme descrito em cada caso.

3.2.2 Deposição de solução de Au 10¹³ NP de Au +lisozima 10uM sobre GC

A solução de Au+lisozima 10 μ M, foi depositada sobre GC pelo método da “gota” com solução de 30ul e tempos de incubação de 5 e 10s. Após o preparo, as

amostras foram “lavadas”, passando-se a GC em gota de 30ul de água MiliQ, em seguida o excesso de material foi retirado com papel absorvente pelas bordas da GC.

3.2.3 Deposição da Lisozima e de NP de Au sobre a GC.

As soluções de lisozima a 10mM foram depositadas diretamente sobre GC (“drop deposition”) usando-se uma alíquota de 15ul com tempo de incubação de 10s. Após o preparo as amostras foram “lavadas”, passando-se a GC em uma gota de 30ul de água MiliQ em papel parafinado, em seguida o excesso de material foi retirado com papel absorvente pelas bordas da GC. Após tempo de espera de 24h para secagem da amostra em dessecador a vácuo, as grades foram depositadas sobre uma gota de 30ul de volume, de solução de NP partículas de Au em concentração de 10^{18} /litro, com tempos de incubação de 5 e 30 minutos, em seguida o excesso de material foi retirado com papel absorvente pelas bordas da GC.

Método da “GOTA”



Figura 3.1 desenho esquemático do método da “gota”

Método de “drop-deposition”

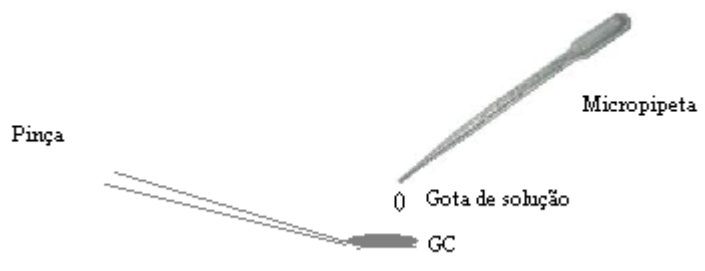


Figura 3.2 desenho esquemático do método de “drop-deposition”

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise e comparações dos resultados obtidos por DLS com as imagens de MET

4.1.1 Análise de DLS das NP de Lisozima

A figura 4.1 mostra um gráfico com a porcentagem relativa á distribuição de diâmetros das NP de lisozima em solução.

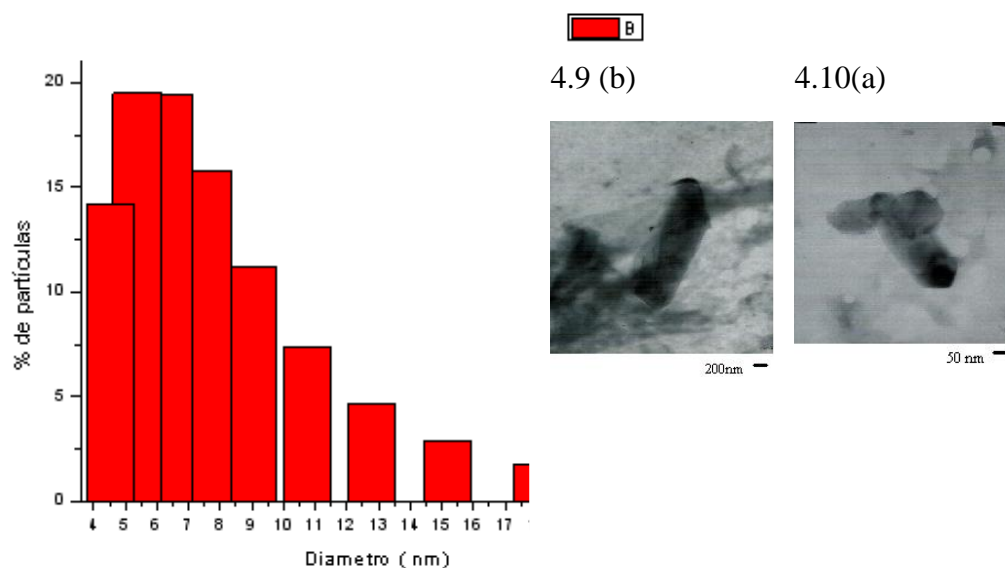


Figura 4.1. Gráfico da distribuição de diâmetros das partículas de lisozima em solução determinados por DLS, juntamente com as imagens de MET de cristais de lisozima aderidos à GC.

As análises de DLS das NP em solução nos mostram que as NP de lisozima em solução apresentam uma distribuição de diâmetros com valor médio bastante inferior às dimensões típicas dos cristais de Lisozima encontradas por MET nas figuras: 4.8(b) e 4.10(a), que tem dimensões da ordem de grandeza de dezenas de nm.

4.1.2 Análise de DLS das NP de Au

A figura 4.2 mostra o gráfico com a porcentagem relativa da distribuição de diâmetros das NP de Au em solução.

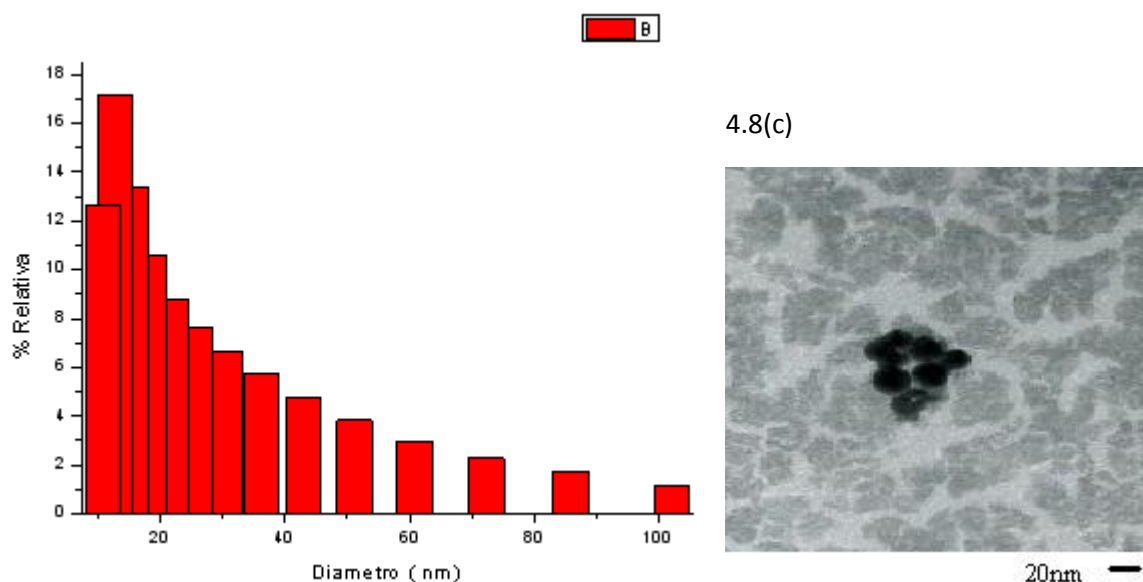


Figura 4.2. Gráfico da distribuição de diâmetros das partículas de lisozima em solução.

As análises de DLS das NP em solução nos mostram que as NP de Au em solução podem corresponder as NP encontradas por MET nas figuras: 4.8(c) e 4.9(a). cabe ressaltar que a medida de NP de Au é significativamente melhor determinada devido à maior capacidade de espalhamento da luz pelo Au, quando comparado à macromoléculas orgânicas.

Comparando-se os gráficos de EDL da figura 4.1 correspondente a determinação de NP de lisozima com os da figura 4.2 correspondente a NP de Au, pode-se concluir que a média do diâmetro das NP de lisozima são menores que a média do diâmetro das NP de Au em solução, também podemos concluir que o diâmetro das partículas de lisozima em solução são bem menores que os cristais encontrados nas imagens de difração, o que sugere que a cristalização das proteínas não estão ocorrendo em solução, mas sim quando interagem com o substrato, evidenciando que o substrato(GC) está atuando como nucleante para a cristalização da lisozima.

Além da caracterização das NP de Au a proposta de uso da técnica de DLS neste caso teve como meta investigar-se a possibilidade de existência de micro-cristais de

lisozima já em solução. Esta possibilidade é descartada com os resultados apresentados acima.

4.2 Análises de imagens de MFA

A figura 4.3 mostra imagens obtidas no MFA da GC revestida com carbono bacteriano. Onde a figura (a) é uma imagem de 10nmX10nm e a figura (b) uma ampliação para 2,5nm x 2,5nm.

MFA da GC- Grade de MET revestida com carbono bacteriano

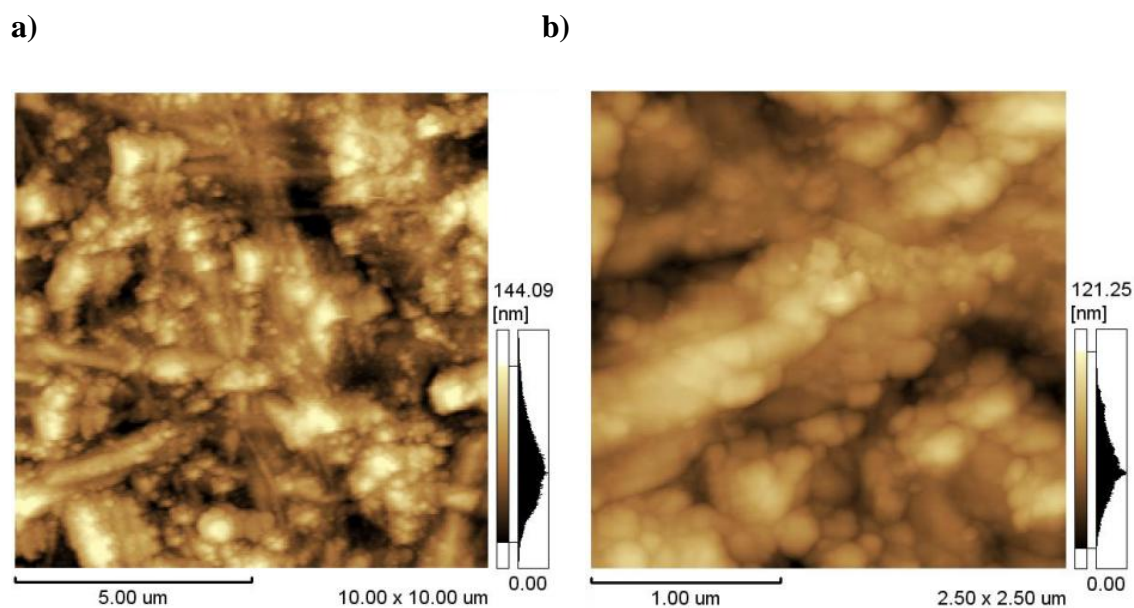


Figura 4.3. Topografia da GC

Nota-se uma grande irregularidade na superfície da GC, resultante das características do carbono de origem bacteriana. Esta irregularidade que chega a 144nm, impossibilita a visualização de NP Au depositadas diretamente na GC.

Na figura 4.4 tem-se uma imagem de (6x6) nm de MFA da GC revestida com solução de lisozima a 10mM.

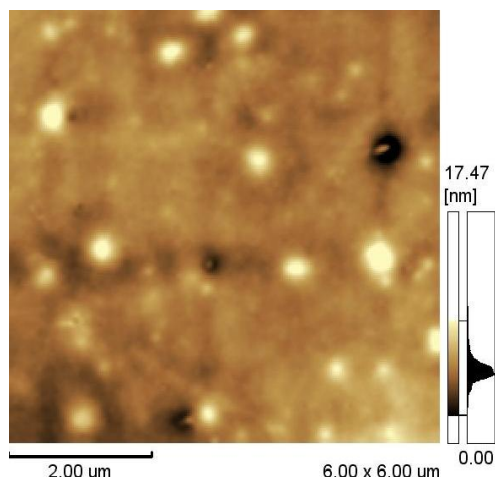


Figura 4.4. Filme resultante de solução 10 mM de lisozima depositado sobre a GC.

O filme mostrado nesta figura foi preparado pelo método de “gota” com um tempo de incubação de 5s, a GC posteriormente foi lavada em água MiliQ. A imagem mostra que a grade foi totalmente coberta formando um filme homogêneo com várias estruturas globulares entre 100 e 500nm de largura, com irregularidade perpendicular máxima de 1,47 nm. Além da lisozima o filme contém os resíduos da solução.

A figura 4.5 mostra imagens de MFA revestidas por solução de lisozima+NP de Au com diferentes tempos de incubação.

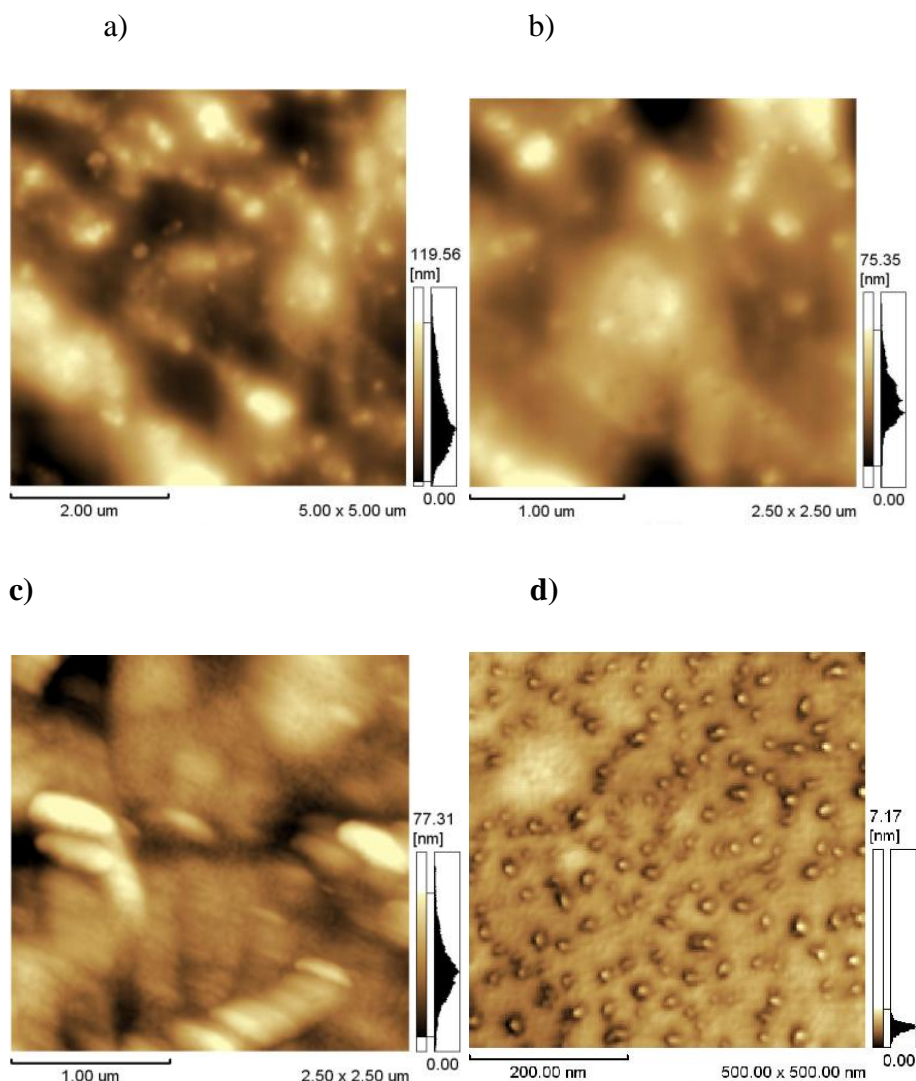


Figura 4.5.(a) aspecto do filme de solução lisozima +Au com tempo de incubação de 5s, (b) detalhe com aumento de 2X, (c) aspecto do filme de solução lisozima +Au com tempo de incubação de 10s. (d) detalhe com aumento de 2X. Nota-se aglomerados porém a irregularidade da superfície não permite conclusões sobre a origem destes.

O filme preparado com uma solução de lisozima a 10 μM +NP de Au em concentração de 10^{13} NP/ml pelo método de “drop deposition” com um tempo de incubação de 10 e 5s, a GC posteriormente foi lavada em água MiliQ. As imagens mostram que houve formação de um filme fino muito parecido em ambos tempos de

incubação, porém a Fig. 4.5 (d) mostra estruturas globulares cobrindo uma região que pode ter origem na presença de NP de Au.

Para uma análise breve da possibilidade das estruturas globulares terem origem nas NP de Au, considere-se que uma gota com 15 μl conterá 10^{10} NP/ml, assim se todas as NP aderirem à GC, com área superficial de aproximadamente 10 mm^2 , teríamos um limite máximo de $1,5 \times 10^9$ NP/ mm^2 . No campo de uma varredura de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ do MFA, para uma distribuição uniforme de NP teríamos aproximadamente 1500 NP ocorrendo a distâncias médias de aproximadamente 250 nm. A fig. 4.5(d) Mostra aproximadamente 100 NP na varredura de $0,5\mu\text{m} \times 0,5\mu\text{m}$, ou seja, 40 vezes mais NP do que a previsão para uma distribuição uniforme. No entanto, este resultado é compatível com a superfície altamente irregular da GC, podendo levar a regiões com maior concentração.

4.3. Análises de imagens de MET

A figura 4.6 mostra a imagem panorâmica de uma Grade de Carbono de MET após a deposição de Lisozima. Pode-se observar uma distribuição não uniforme, não cobrindo totalmente a área da GC.

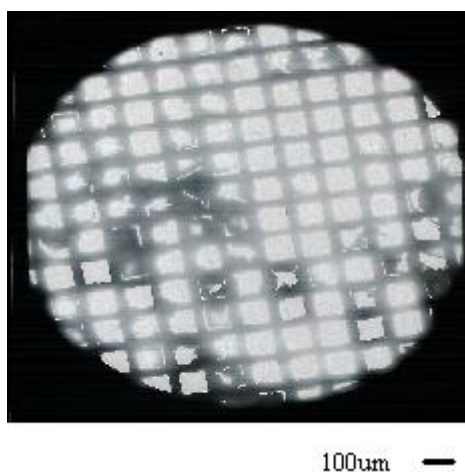


Figura 4.6. Imagem de uma GC após o depósito de lisozima, mostrando a distribuição irregular do filme depositado.

A figura 4.7 nos mostram imagens da amostra preparada pelo método da “gota” com solução de lisozima a 10mM, com um tempo de incubação de 5s e lavada em água MiliQ. As figuras de difração foram obtidas a 80 keV e cte de câmera 2,56 nm.mm

Na figura 4.7(a) pode-se observar vários cristais de lisozima, e na 4.7(b) um cristal de lisozima de geometria retangular de aproximadamente 1 μ m de aresta e uma figura de difração do cristal da figura 4.7 (b) com distribuição irregular de pontos, sugerindo uma característica policristalina com uma distribuição descontínua de orientações.

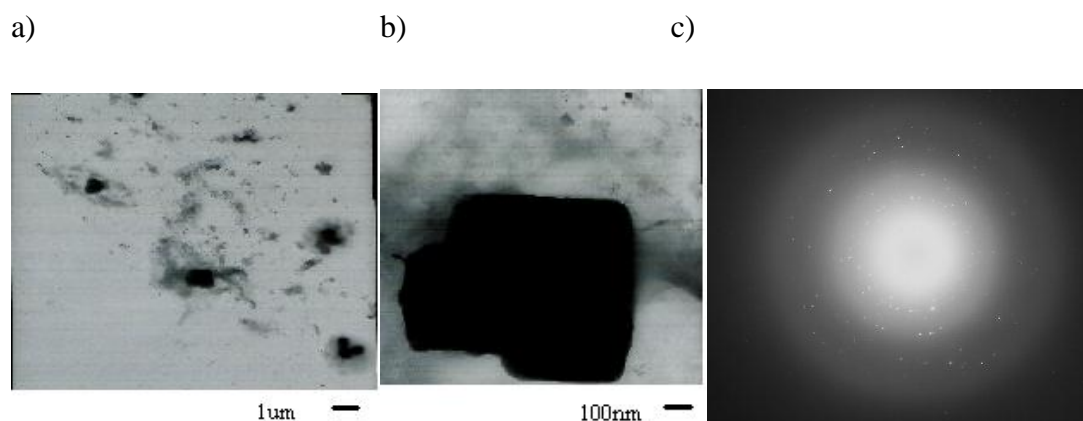


Figura 4.7. imagem de cristais de lisozima(a); imagem ampliada de um cristal de lisozima(b); figura de difração do cristal de lisozima(c)

A figura 4.8 nos mostram imagens das amostras preparadas com solução de lisozima a 10mM pelo método de “drop deposition” com tempo de incubação de 10s, após 24 h foram depositadas NP de Au pelo método da “gota” e incubadas por 30 min.

A figura 4.8(a) mostra que existem muitas estruturas globulares e a figura 4.8(b) é uma ampliação dessa região. Na figura 4.8(c), a ampliação da figura 4.8(b), mostra detalhes como um conjunto de NP de Au, e a figura 4.8(d) refere-se ao padrão de difração das NP de Au.

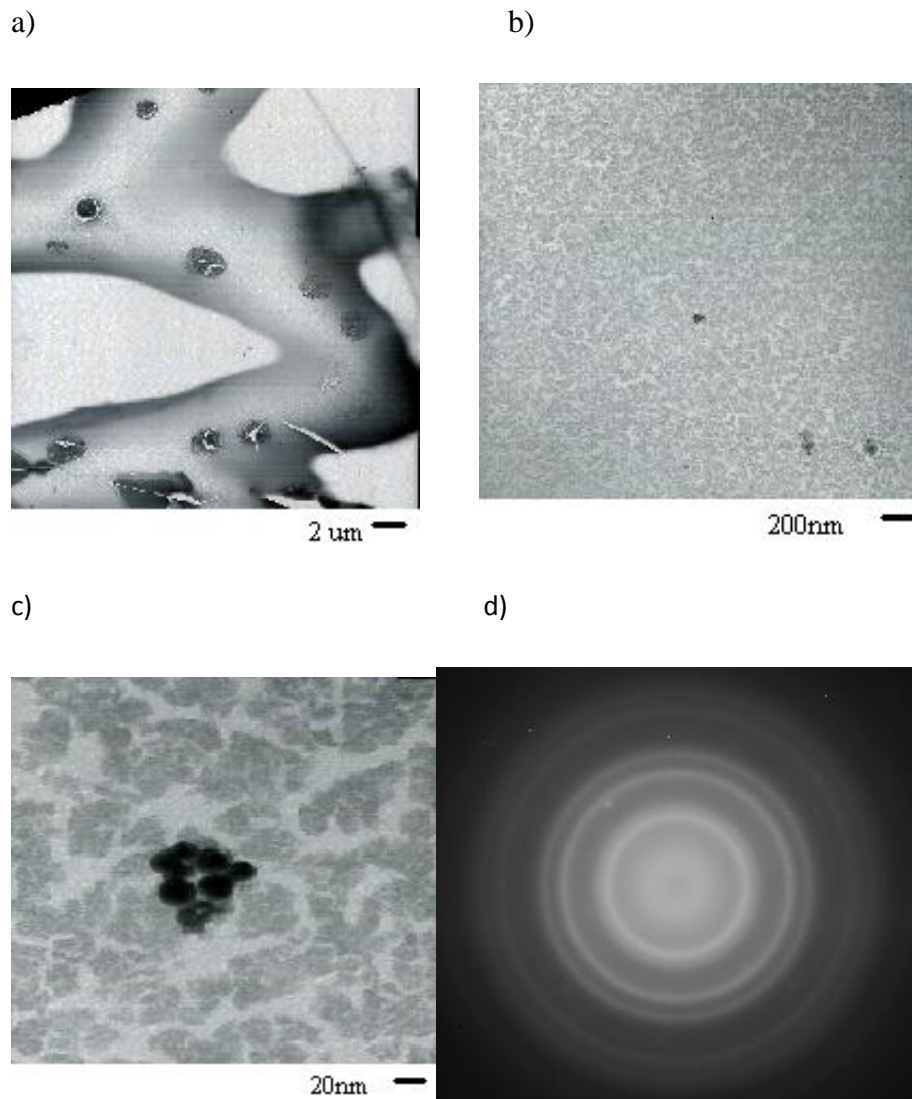


Figura 4.8. (a) imagem de uma região onde está ocorrendo difração, (b)ampliação da imagem.(c) ampliação da imagem mostrando NP de Au. (d)figura de difração na região das NP de Au.

A figura 4.9 nos mostra imagens das amostras preparadas com solução de lisozima a 10mM pelo método de “drop deposition” com tempo de incubação de 10s, após 24 h foram depositadas NP de Au pelo método da “gota” e incubadas por 1 min.

Podemos observar em 4.9(a) NP de Au de aproximadamente 50nm, um monocristal de lisozima pode ser visualizado em 4.9(b) e a figura de difração deste monocristal é mostrada em 4.9(c), podendo ser relacionados as características cristalográficas da lisozima ortorrômbica como veremos posteriormente.

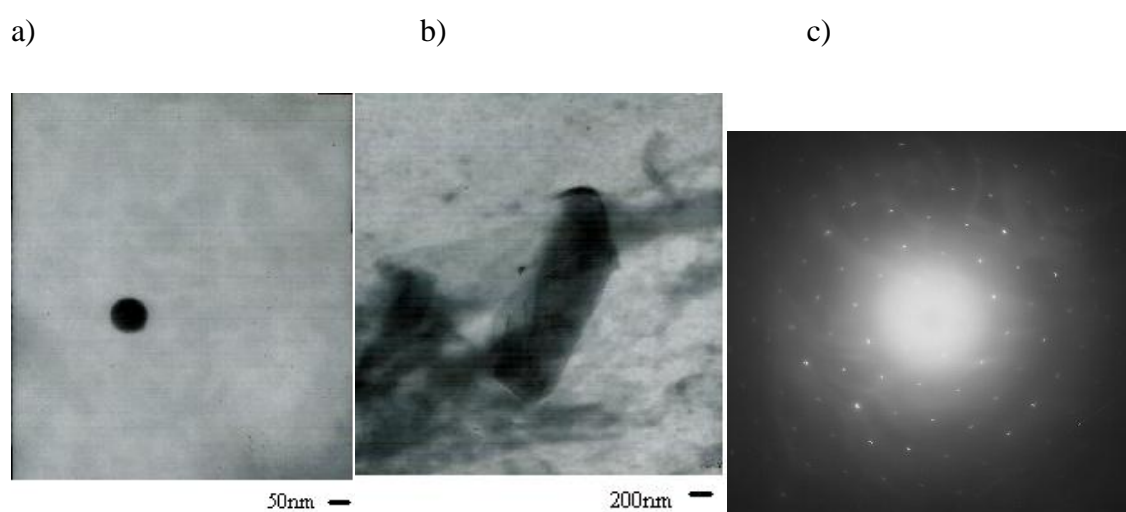


Figura 4.9 (a) imagem com uma NP de Au de aproximadamente 40nm, (b)imagem possivelmente de um cristal de lisozima, (c)figura de difração do cristal de lisozima.

A figura 4.10 nos mostram imagens das amostras preparadas com solução de lisozima a 10 μ M pelo método de “drop deposition” com tempo de incubação de 10s.

Podemos observar um possível monocristal em 4.10(a), a figura de difração correspondente em 4.10(b), que pode ser associada com as características cristalográficas da lisozima ortorrômbica.

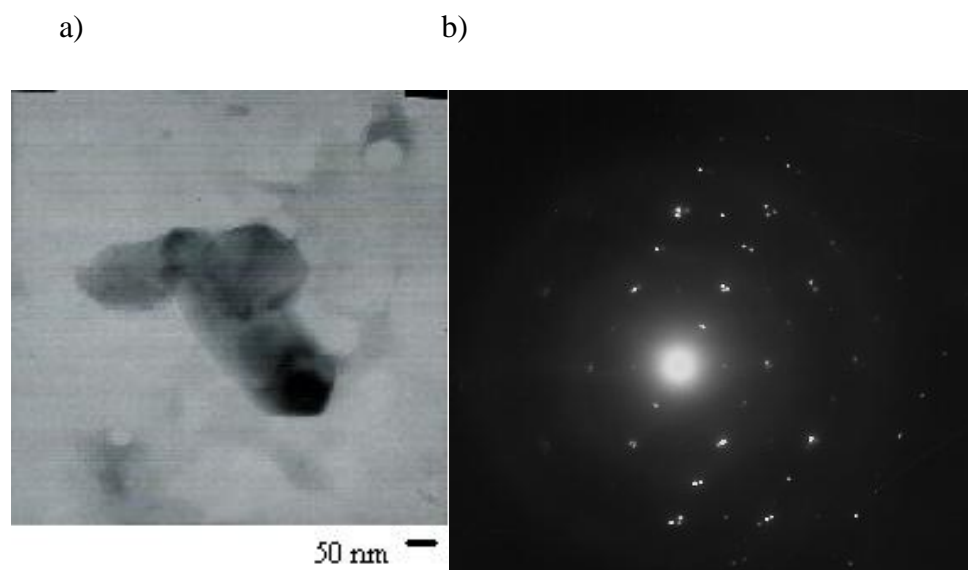
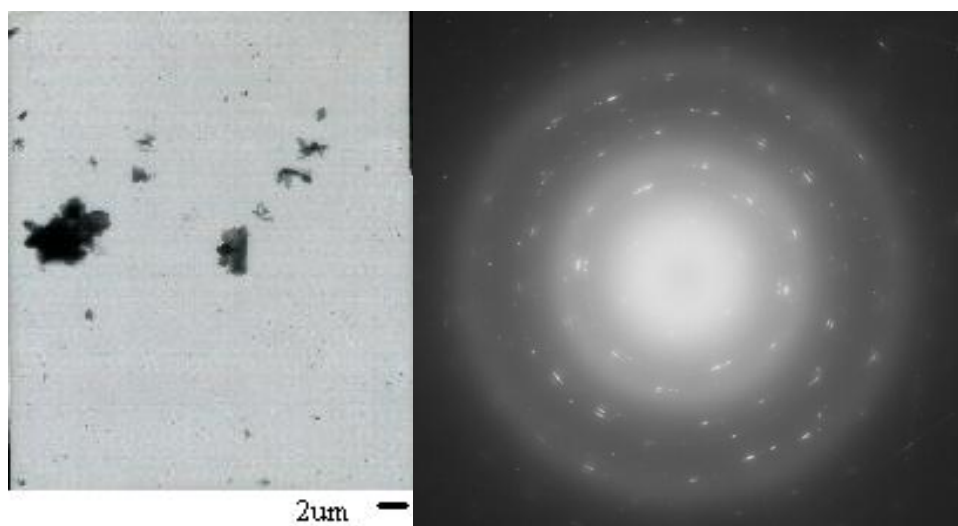


Figura 4.10 imagem de um cristal possivelmente de lisozima e figura de difração da mesma região.

A figura 4.11 nos mostram imagens das amostras preparadas com solução de lisozima a $10\mu\text{M}$ + NP de Au em concentração de 10^{13} NP/ml , pelo método de “drop deposition” com tempo de incubação de 5s.

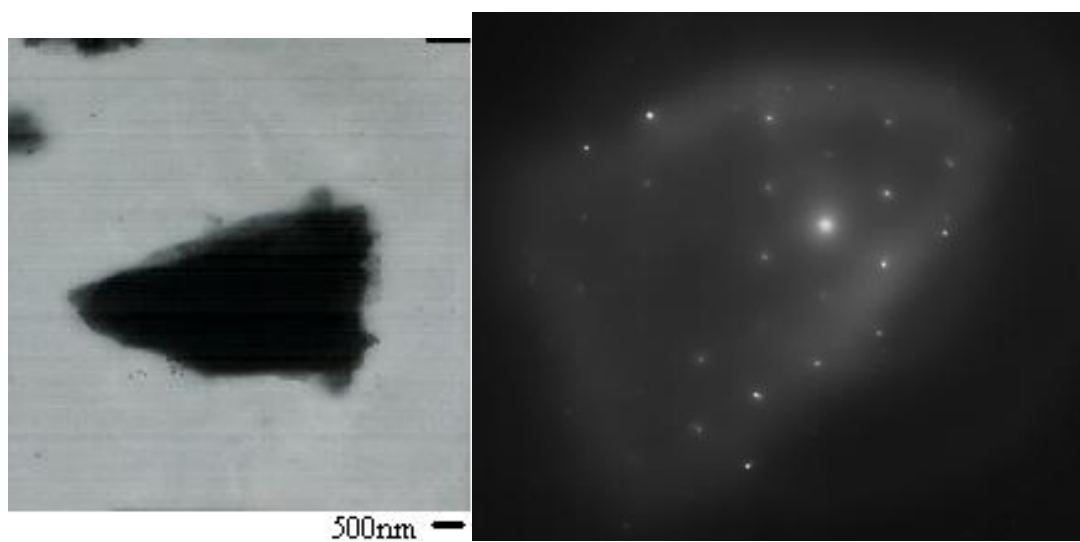
a)

b)



c)

d)



e)

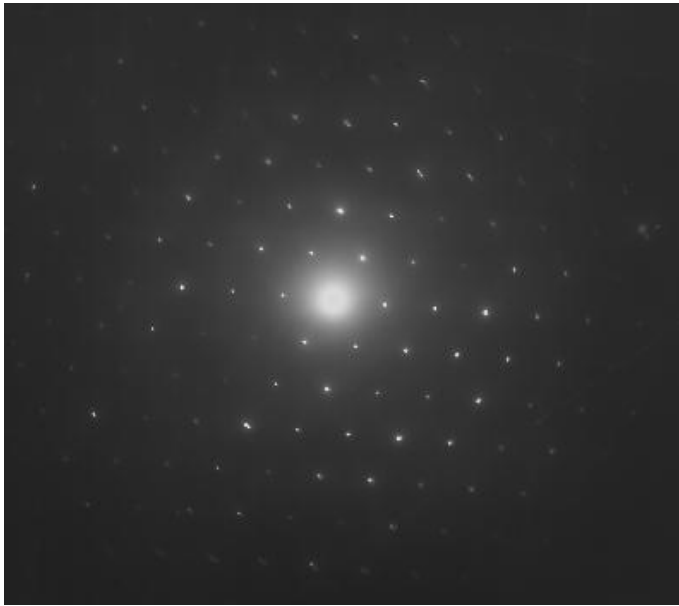


Figura 4.11.(a) imagem de uma região com muitos cristais, (b)figura de difração de um monocristal possivelmente de lisozima, (c)imagem de um cristal e figura de difração deste, (d) e (e) detalhes da difração provavelmente do cristal de lisozima.

A figura 4.11(a) mostra que houve formação de uma região policristalina em, (b) a difração desta região em, (c) imagem de um monocristal e (d) e (e) correspondem a difração desse monocristal, com padrão de pontos que será relacionados com as características cristalográficas da lisozima ortorrômbica.

4.4. Análise da Difração

Para análise das imagens de difração, usamos a página pessoal de Steffen Weber[49] onde obtivemos as projeções estereográficas referentes a diferentes estruturas da lisozima encontradas na literatura. Considerando as principais direções de incidência do feixe para cada estrutura, pudemos encontrar a projeção estereográfica que melhor corresponde às imagens de difração obtidas. A seguir são mostrados, como ilustração, os resultados para a estrutura tetragonal

1-Supondo a lisozima tetragonal com parâmetros de célula unitária de $a = 79,1 \text{ \AA}$ e $c = 37,9 \text{ \AA}$ com direção de feixe incidente $[0\ 1\ 0]$, $[1\ 0\ 0]$ e $[0\ 0\ 1]$ teremos as seguintes projeções estereográficas respectivamente.

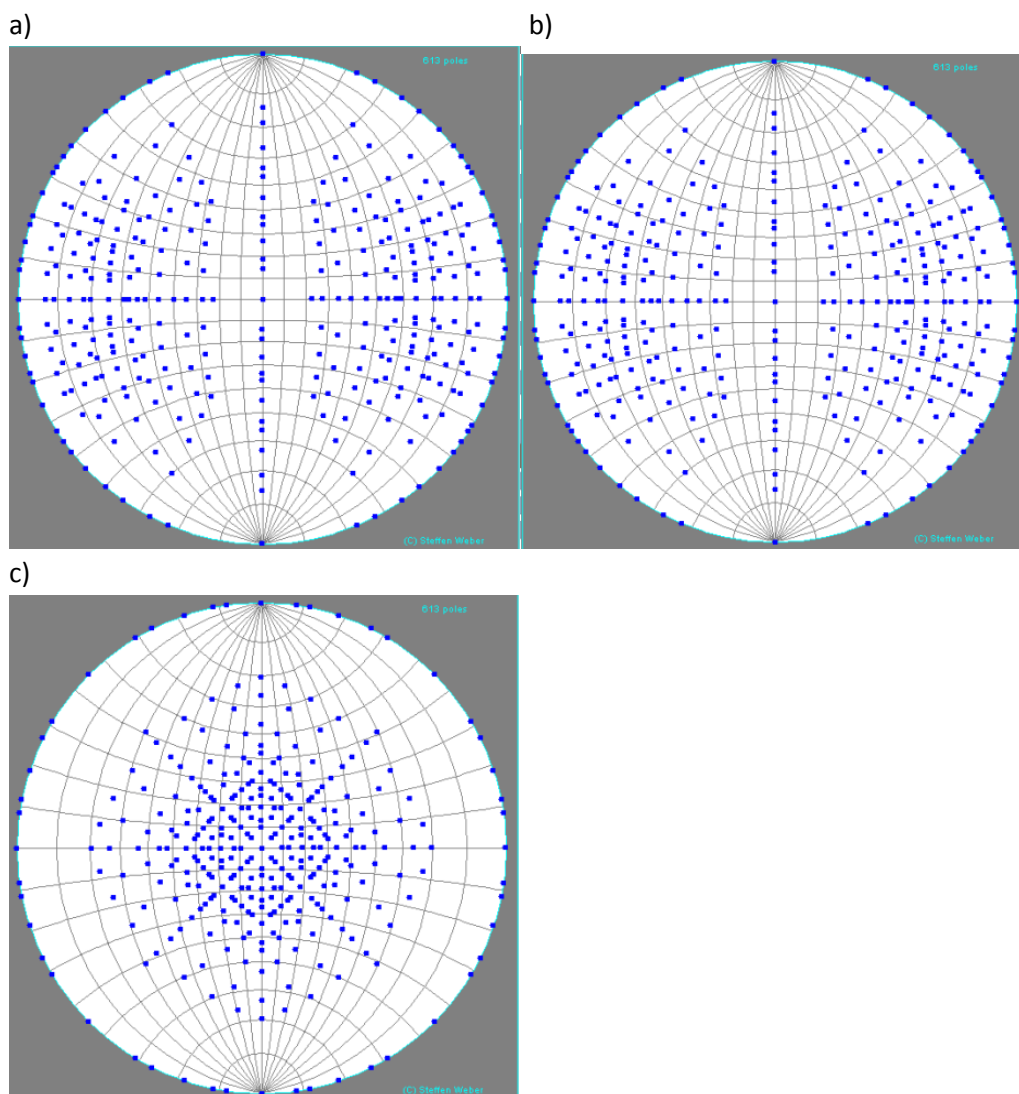


Figura 4.12 Projeção estereográfica da lisozima tetragonal com direção de feixe incidente, a) $[0\ 1\ 0]$, b) direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$ e c) direção de feixe incidente $[0\ 0\ 1]$.

Ao compararmos as simetrias na figura 4.12 com as obtidas experimentalmente na figura de difração, não identificamos relações angulares consistentes. De fato, considera-se somente os pontos da circunferência externa, que formam 90° com o feixe incidente. As relações angulares entre estes pontos devem ser as mesmas que aquelas da imagem de difração.

2-Supondo a lisozima ortorrômbica com parâmetros de célula unitária de $a=31 \text{ \AA}$, $b=52,5 \text{ \AA}$ e $c=89 \text{ \AA}$ com direção de feixe incidente $[0 0 1]$, $[0 1 0]$ e $[1 0 0]$ teremos as seguintes projeções estereográficas respectivamente.

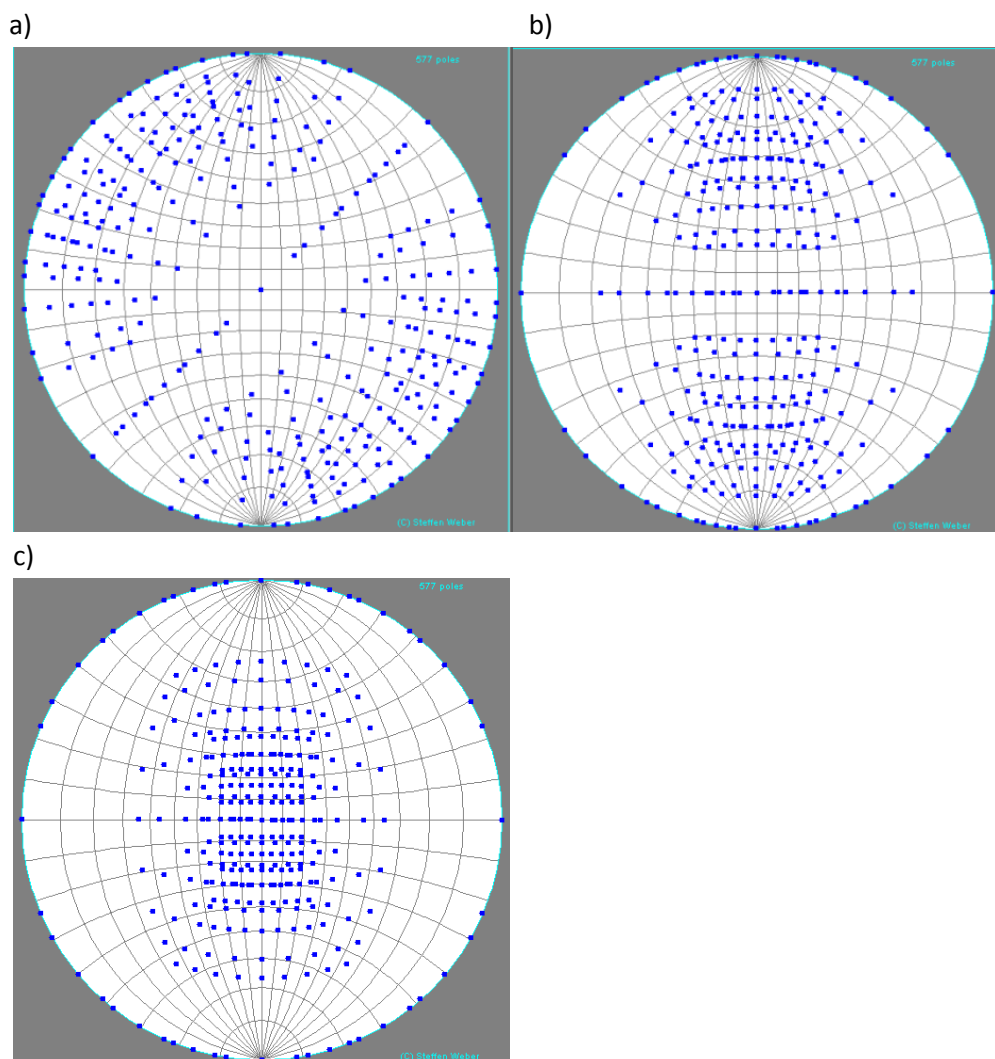


Figura 4.13 a) Projeção estereográfica da lisozima ortorrômbica com direção de feixe incidente $[0 0 1]$, b) direção de feixe incidente $[0 1 0]$ e c) direção de feixe incidente $[1 0 0]$. As figuras 4.13(a) e (b) não apresentam correlação com as simetrias observadas na difração, enquanto na figura 4.13(c) podemos observar relações de

simetria angular dos pontos da projeção estereográfica com as obtidas experimentalmente.

Na figura 4.14 podemos observar a correspondência angular dos pontos destacados em vermelho, através da sobreposição da imagem da figura obtida experimentalmente e a figura da projeção estereográfica da lisozima ortorrômbica com direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$.

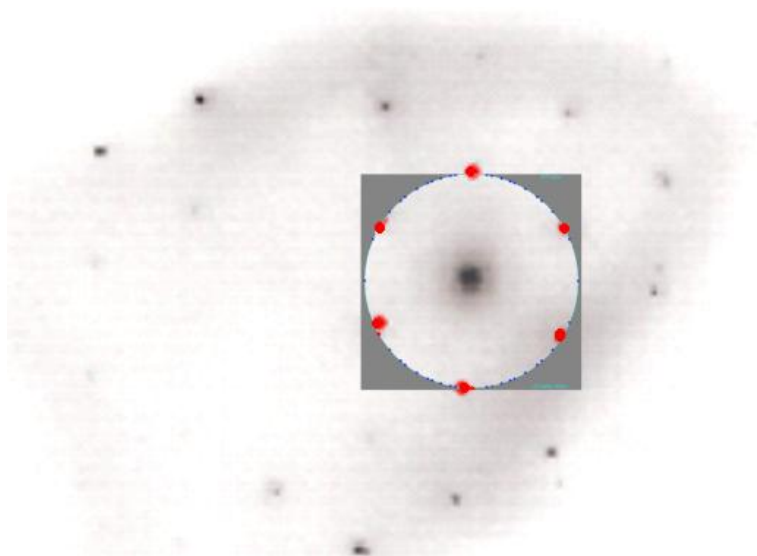


Figura 4.14 Sobreposição da imagem obtida por MET de cristal de lisozima com a projeção estereográfica da lisozima ortorrômbica com parâmetros de célula unitária $a = 31\text{\AA}$, $b = 52,5\text{\AA}$ e $c = 89\text{\AA}$. com direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$.

Além da correspondência angular já identificada na Figura 4.14, ainda podemos encontrar mais pontos de correspondência como na Figura 4.15. Fica assim evidenciada a correspondência angular dos pontos destacados em vermelho, na sobreposição da imagem obtida experimentalmente e a figura da projeção estereográfica da lisozima ortorrômbica com direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$.

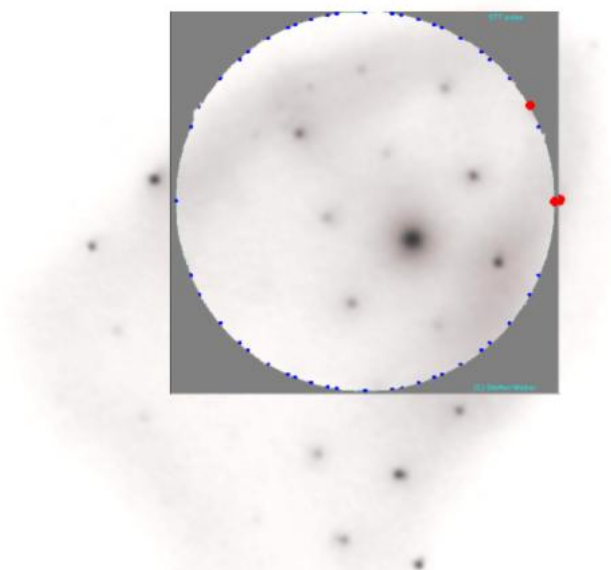


Figura 4.15 Sobreposição da imagem obtida por MET de cristal de lisozima e da projeção estereográfica da lisozima ortorrômbica com parâmetros de célula unitária $a = 31\text{\AA}$, $b = 52,5\text{\AA}$ e $c = 89\text{\AA}$. com direção de feixe incidente $[1\ 0\ 0]$.

IMAGEM DE DIFRAÇÃO FIGURA 4.11

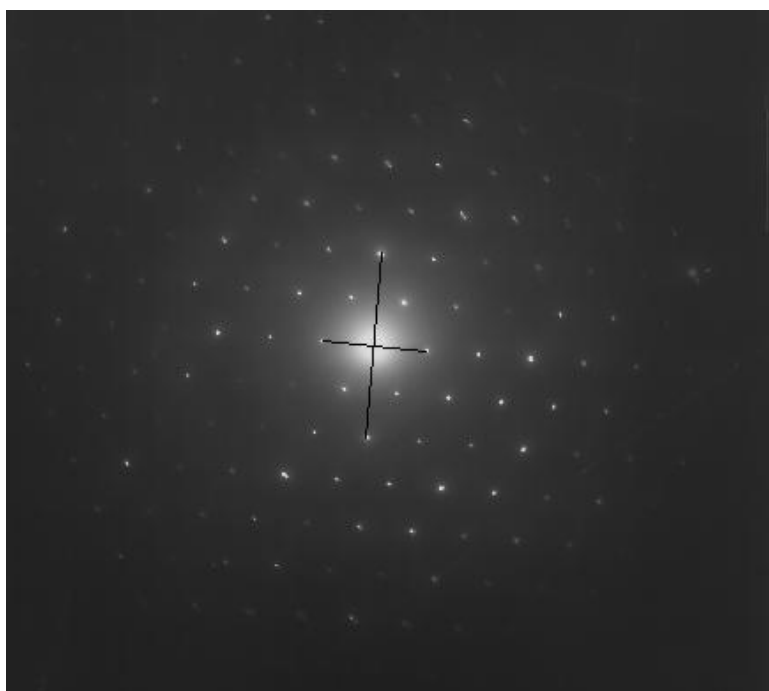


Figura 4.16. Detalhes da figura 4.11(e)

Verificando a consistência da razão das distâncias entre os pontos equidistantes do centro e ortogonais, conforme a figura 4.16. Esta razão deve ser igual ao inverso da razão entre os parâmetros de rede correspondentes. Assim, determina-se a relação D_{0k0}/D_{00l} . Onde D_{0k0} e D_{00l} são os comprimentos ortogonais indicados na fig. 4.16.

Neste caso, a razão $D_{010}/D_{001} = 1,7$ corresponde a relação $c/b = 89/52.5 = 1,695$ de um cristal de lisozima cuja projeção estereográfica é apresentada na fig. 4.13(c) .

Este resultado pode ser confirmado comparando-se as relações angulares entre os planos da projeção estereográfica correspondente à direção $[1,0,0]$ para uma célula unitária com $a = 3,1$ nm , $b = 5,25$ nm e $c = 8,9$ nm. A tabela(4.1) relaciona os ângulos entre os planos com índices (h_1, k_1, l_1) com aqueles (h_2, k_2, l_2) . Foram utilizados H,K,L maiúsculos para destacar a necessidade de parametrização em relação a um único parâmetro de rede. Normalmente utiliza-se o parâmetro b . Nota-se que os ângulos, correspondem exatamente a aqueles calculados para os parâmetros de rede da lisozima ortorrômbica.

Tabela 4.1. Relação dos ângulos entre os planos com índices (h_1, k_1, l_1) com aqueles (h_2, k_2, l_2) . Comprimentos normalizados em relação ao parâmetro b .

H1	K1	L1	H1.b/a	K1	L1.b/c	H2	K2	L2	H2.b/a	K2	L2.b/c	Ângulo
0	0	-1	-0,5899	0	-0,5899	0	1	-3	0	1	-1,7697	29,5
0	0	1	0,5899	0	0,5899	0	1	-1	0	1	-0,5899	120,5
0	1	-1	-0,5899	1	-0,5899	0	1	1	0	1	0,5899	61,1
0	1	0	0	1	0	0	1	3	0	1	1,7697	60,5
0	1	1	0,5899	1	0,5899	0	0	1	0	0	0,5899	59,5
0	0	1	0,5899	0	0,5899	0	-1	3	0	-1	1,7697	29,5
0	0	1	0,5899	0	0,5899	0	-1	1	0	-1	0,5899	59,5
0	-1	1	0,5899	-1	0,5899	0	-1	0	0	-1	0	30,5
0	0	-1	-0,5899	0	-0,5899	0	1	-4	0	1	-2,359	23,0

Equação de determinação do ângulo

$$\cos\theta_{ij} = \frac{h_i \cdot h_j + k_i \cdot k_j + l_i \cdot l_j}{\sqrt{h_i^2 + k_i^2 + l_i^2} \cdot \sqrt{h_j^2 + k_j^2 + l_j^2}}$$

(15)

Tentativa de indexação dos planos difratantes.

O intervalo possível de observação de difração está entre os diâmetros limitados pela região central saturada pelo feixe incidente (raio de ~4,5mm) e as dimensões do campo de visão lateral (raio de ~25mm). Estes valores limitam a observação da difração a ângulos entre a direção do feixe incidente e o feixe difratado (2 x ângulo de Bragg), até um máximo de aproximadamente ~5 graus.

Considerando os altos parâmetros de rede da lisozima, os índices h,k,l observáveis serão altos conforme tabela 4.2. Nesta tabela são mostrados os planos (h,k,l) possíveis de observação na geometria deste experimento e perpendiculares a direção do feixe incidente [1,0,0].

Equação de determinação dos $d_{h,k,l}$ para a estrutura ortorrômbica, $a = 3,1$ nm , $b = 5,25$ nm e $c = 8,9$ nm

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{k^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$$

(16)

Tabela 4.2 Planos (h,k,l) possíveis de observação na geometria deste experimento e perpendiculares a direção do feixe incidente [1,0,0].

H	K	L	D (angstroms)	R (mm)
Direção [0,0,1]				
0	0	10	8,90	2,88
0	0	15	5,93	4,32

0	0	16	5,56	4,60
0	0	17	5,23	4,89
0	0	18	4,94	5,18
Direção [0,1,0]				
0	9	0	5,83	4,39
0	10	0	5,25	4,88
0	11	0	4,77	5,36
0	12	0	4,37	5,85
0	13	0	4,04	6,34
0	14	0	3,75	6,83
0	15	0	3,50	7,31
0	16	0	3,28	7,80
0	17	0	3,09	8,29
0	18	0	2,92	8,78
Direção [0,1,-1]				
0	8	-8	5,65	4,53
0	9	-9	5,02	5,10
0	10	-10	4,52	5,66
0	11	-11	4,111	6,228
0	12	-12	3,77	6,79
0	13	-13	3,48	7,36
0	14	-14	3,23	7,93
0	15	-15	3,01	8,49
0	16	-16	2,83	9,06
0	17	-17	2,66	9,62
0	18	-18	2,51	10,19
Direção [0,1,3]				
0	4	12	6,46	3,96

0	5	15	5,17	4,96
0	6	18	4,30	5,95
0	7	21	3,69	6,94
0	8	24	3,23	7,93
0	9	27	2,87	8,92
0	10	30	2,58	9,91
0	11	33	2,35	10,90
0	12	36	2,15	11,89
0	13	39	1,99	12,88

Na tabela 4.2 foram consideradas as principais direções ortogonais ao feixe incidente e mostradas na projeção estereográfica. Calcula-se assim os parâmetros de rede possíveis de observação e que devem ser comparados com os valores obtidos experimentalmente.

Tabela 4.3 Considerando a figura 4.17 obtém-se os valores indicados abaixo para as direções da projeção estereográfica $[0,0,-1]$, a ortogonal $[0,1,0]$ e a direção $[0,1,-1]$ formando o ângulo de $59,5^\circ$ com $[0,0,-1]$

Raio (mm)	D (Angstroms)
Direção $[0,0,-1]$	
5,08	5,04
10,03	2,55
15,11	1,69
20,23	1,26
Direção $[0,1,0]$	
8,805	2,91
17,55	1,46
Direção $[0,1,-1]$	

5,06	5,06
10,1	2,53
15,09	1,7

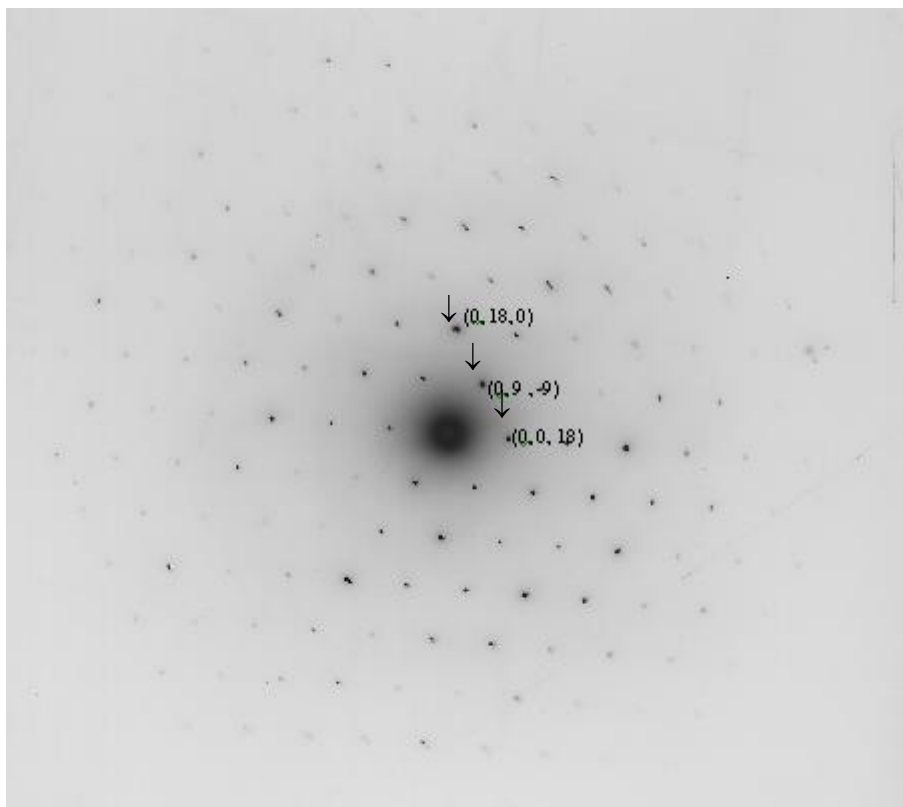


Figura 4.17 Indexação da orientação dos planos cristalográficos para a figura 4.11(b) de difração.

Relacionando a imagem da Figura 4.17 com a projeção estereográfica, obtemos as possíveis orientações dos planos cristalográficos, relacionados às distâncias calculadas apresentadas na tabela 4.3 com as distâncias experimentais determinadas pela equação 4.2 apresentadas na tabela 4.2. Podemos associar os pontos a orientação $[0\ 1\ 0]$, $[0\ 1\ 1]$, $[0\ 0\ 1]$ com os valores: $d = 2,91\text{\AA}$ associado aos planos $[0\ 18\ 0]$, $d = 5,02\text{\AA}$ associado aos planos $[0\ 9\ -9]$ e para $d = 4,94\text{\AA}$ os planos $[0\ 0\ 18]$.

Tabela 4.4 Valores indicados para as direções determinadas da projeção estereográfica considerando a figura 4.17.

Raio (mm)	D (Angstroms)
Direção [0,1,-3]	
4,93	5,19
9,85	2,60
Direção [0,1,-1]	
8,50	3,13
17,23	1,14
Direção[0,1,3]	
5,06	5,06

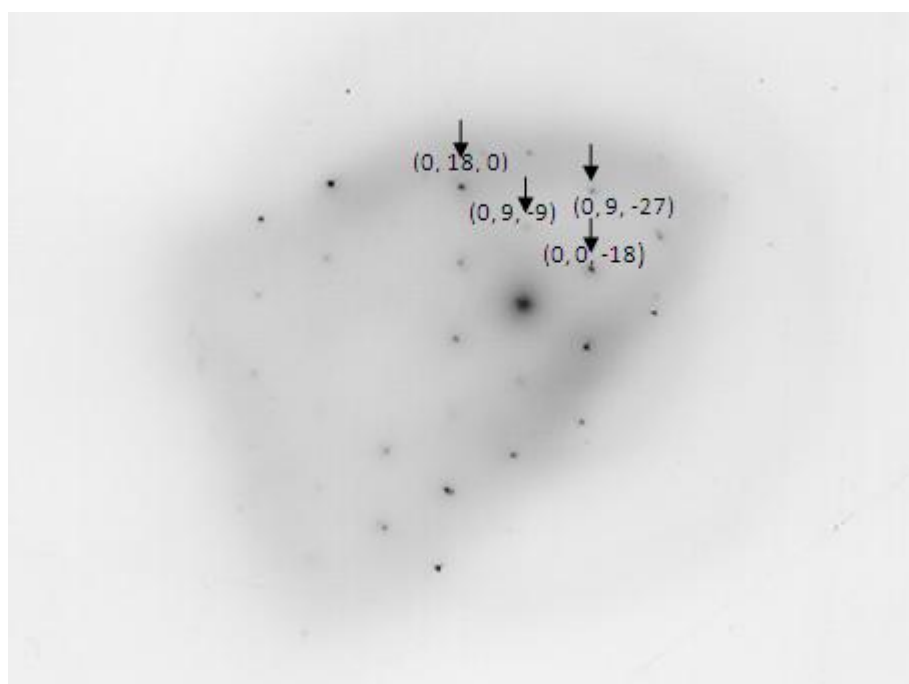


Figura 4.18. Indexação dos planos cristalográficos na figura 4.11d.

Relacionando a imagem da Figura 4.18 com a projeção estereográfica, obtemos as possíveis relações angulares. Buscando a correspondência entre as distâncias apresentadas na tabela 4.4, com as distâncias experimentais determinadas pela equação 4.2 apresentadas na tabela 4.2, podemos associar os pontos a orientação (0 1 0), medindo o valor dos $d(s)$ dos pontos indexado. Para o $d = 2,91\text{\AA}$ associamos ao plano [0 18 0], para $d=5,02$ associamos o plano [0 9 -9], $d= 2,87$ para o plano [0 9 27] e para $d= 4,94$ associamos o plano [0 0 -18]

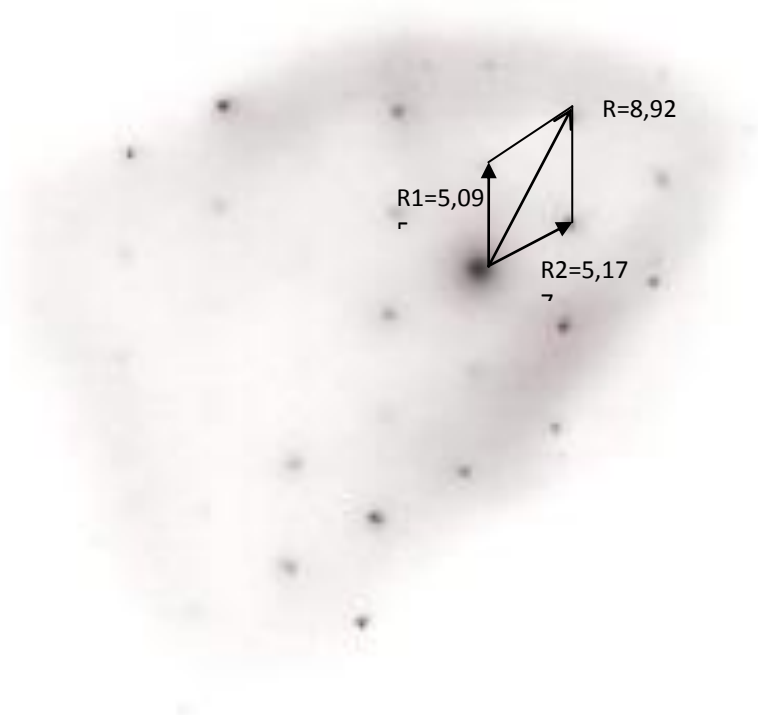


Figura 4.19 Demonstração da regra do paralelograma da figura 4.18, mostrando a resultante R da soma dos vetores R_1 e R_2 .

Para demonstrar a consistência entre os raios usamos a regra do paralelogramo:

Sendo que R , R_1 e R_2 são os raios encontrados para as distâncias interplanares $D(h,k,l)$ correspondentes aos planos $(0\ 9\ 27)$, $[0\ 9\ -9]$ e $(0\ 0\ 18)$, respectivamente mostrados na tabela 4.2 e já indexados na figura.17 e o ângulo $\alpha = 59,5^\circ$.

Da lei dos cossenos os vetores, com $R_1 = 5,095\text{ mm}$, $R_2 = 5,17\text{mm}$, com ângulo entre eles sendo $\alpha = 59,5^\circ$ teremos:

$$R = \sqrt{R_1^2 + R_2^2 + 2 \times R_1 \times R_2 \times \cos \alpha} \quad (17)$$

$$R = \sqrt{5,095^2 + 5,177^2 + 2 \times 5,095 \times 5,177 \times \cos 60}$$

$$R = 8,9\text{ mm}$$

Nota-se que existe uma simetria quase hexagonal, podendo-se observar que podem ser desenhados 06 paralelogramos equivalentes.

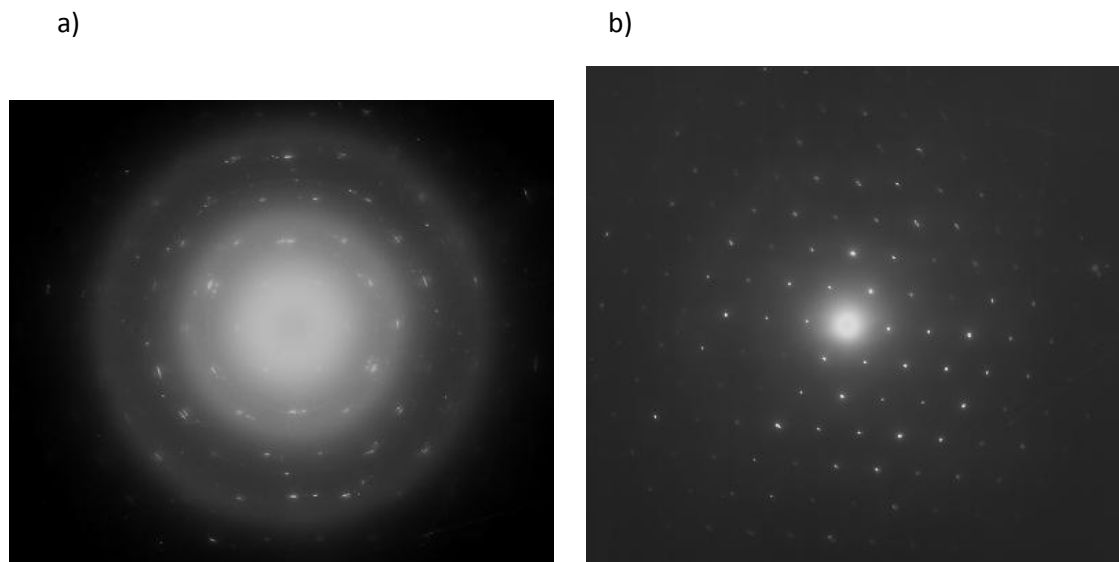


Figura 4.20 Comparação entre as figuras .4.11b de um monocristal com a figura de um policristal 4.11 e

A figura 4.20 mostra padrões de difração de cristais de uma amostra preparada com solução de lisozima a $10\mu\text{M}$ + NP de Au em concentração de 10^{13} NP/ml, pelo método de “drop deposition” com tempo de incubação de 5s.

Comparando a imagem de difração da figura 4.20 (a) que evidencia a difração de uma região policristalina, com a imagem da Fig. 4.20 (b) que evidencia a difração de um monocristal, podemos perceber, que o anel mais interno da figura 4.20 (a) apresenta pontos que tem o formato aproximadamente hexagonal, assim como os pontos mais internos da figura 4.20 (b), podemos perceber de fato que a figura 4.20(a) nada mais é que a figura (b) girada de forma descontínua, se ela fosse girada de forma contínua teríamos os anéis, portanto, a figura 4.20 (a) tem as mesmas orientações cristalográficas que a figura 4.20 (b) e também que os círculos mais internos são obscurecidas pelo espalhamento dos elétrons gerado pela natureza policristalina e até mesmo amorfa de algumas regiões.

5. CONCLUSÕES.

O uso de grades de MET cobertas com Carbono Bacteriano (GC) para investigação da cristalização de proteínas possibilita ganho de tempo e facilidade na investigação da formação de micro e nano cristais. As análises de DLS da solução de proteína mostraram somente partículas com dimensões típicas da unidade protéica de lisozima, mostrando ausência de cristalização na solução.

A combinação de uso de MET com MFA pode ser útil na caracterização de cristais de proteínas, porém a irregularidade na camada de revestimento compromete seriamente a utilidade da MFA, que fica limitada a observação de eventuais aspectos geométricos evidentes em cristais com dimensões superiores às irregularidades do revestimento da GC.

A difração de elétrons na MET consiste em recurso especialmente útil pela forma inequívoca de caracterização de regiões cristalinas e dos espaçamentos entre planos cristalográficos.

A ausência de evidência de difração para planos com índices de Miller menores é em parte justificada pelos grandes parâmetros de rede da Lisozima. Porém, uma tentativa de observar-se distâncias interplanares maiores, utilizando-se comprimentos de câmara $L = 1200$ mm, apresentou a mesma ocorrência de pontos que parece extinguir-se para parâmetros de rede maiores do que 0,51 nm. A lisozima utilizada contém pelo menos 90% de lisozima e aproximadamente 10% de sais de Acetato de Sódio e Cloreto de Sódio, sendo assim, pouco provável que outra substância possa estar contribuindo na difração. Assim, embora a difração sugira claramente tratar-se de lisozima a repetição deste experimento procurando-se crescer microcristais maiores é desejável.

As melhores condições de formação de cristais de lisozima foram obtidas para concentrações de 10 μ M, contendo 10^{13} NP de Au, usando o método gota com tempo de incubação de 5s

A formação de cristais de lisozima não depende criticamente da presença NP de Au. A própria superfície da GC pode atuar como centro de nucleação, como observado na figura 4.10. No entanto, nota-se que com a presença de NP de Au ocorre a formação

de um grande número de cristais conforme evidenciado nas figuras 4.9 e 4.11 e principalmente nas varreduras de toda a GC.

Os parâmetros de rede calculados das figuras de difração dos cristais de lisozima são comparáveis às distâncias interplanares associadas aos índices de Miller da Lisozima ortorrômbica com parâmetros de célula unitária de 31Å, 52,5 Å e 89Å em todas as figuras de difração.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

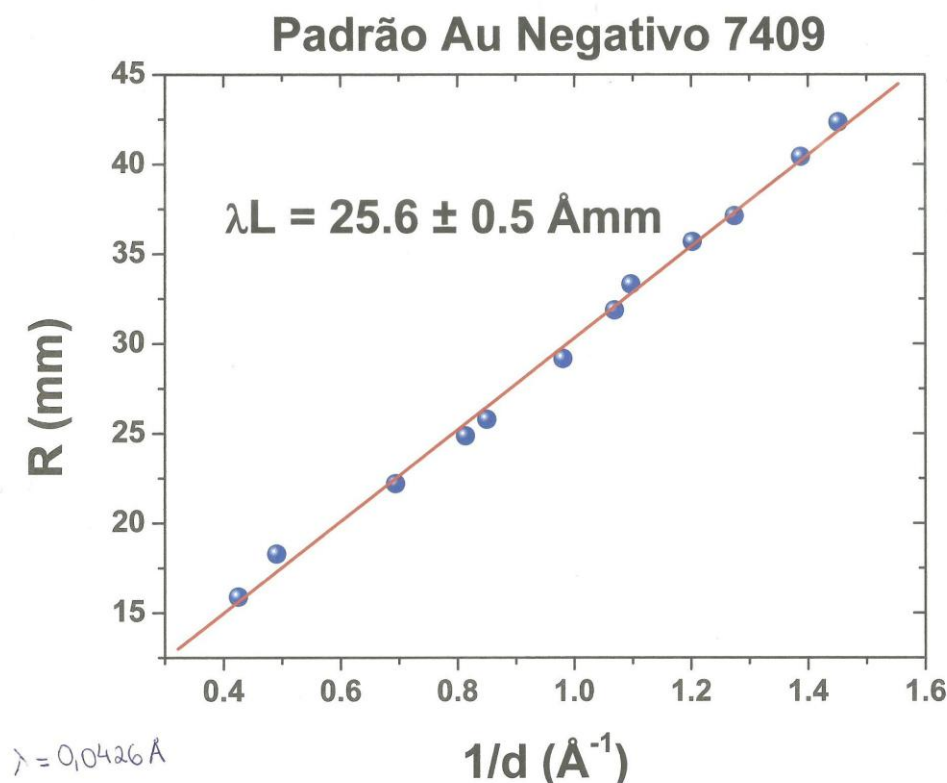
- **Questões que permanecem em aberto:**

- 1. Considerando que não detectou-se alargamento nos picos de difração, por que não foi possível observar difração para distâncias interplanares maiores do que 0,52nm?**
- 2. Qual é o papel das NP e do substrato no processo de cristalização?**
- 3. Quais são as condições ideais (concentração e tempo de incubação) para formação dos nano e micro cristais?**

- **Sugestões para trabalhos futuros:**

- 1. Para possibilitar o uso da MFA seria aconselhável a utilização de grades para MET com superfície regular em escala nanométrica.**
- 2. Controlar em detalhe as condições iniciais de pH, testando também concentrações iniciais menores.**
- 3. Utilizar um suporte de amostra com possibilidade de variar a inclinação em relação ao feixe incidente.**
- 4. Utilizar as amostras onde existem evidências de micro e nanocristais, para sobre estas crescer cristais com dimensões que possibilitem a análise com Raio X.**

Apêndice. Dados adicionais fundamentais para o método de Difração por área Seleccionada.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GRAY, Jeffrey J. The interaction of proteins with solid surfaces. **Current opinion in structural biology**. Baltimore, v. 14, p.110-115, 2004.
- [2] KIM, David T.; BLANCH, Harvey W; RADKE, Clayton J.. **Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy**. Current opinion in structural biology. California, p.5841-5850. jun. 2002.
- [3] KEEL, T. **The application of in situ AFM to the study of molecular and macromolecular crystallization**. PhD thesis, University of Nottingham.2004
- [4] JOHNSON, A. B. ; LEWIS. J. **Molecular Biology of the Cell**. 4.ed. New York: Garland Science; 2002
- [5] PECHKOVA, E.; TRIPATHI, S.; SPERA, R. **Groelcrystalgrowth and characterization**. Biosystems. Roma, p.223-227, jul. 2008.
- [6] PECHKOVA, E. ; NICOLINI, C. **From art to science in protein crystallization by means of thin-film nanotechnology**. Nanotechnology 13, 460–464 . 2002

- [7] PECHKOVA E, NICOLINI C. **Protein Nanocrystallographie: A New Approach to Strucutural Proteomics.** *Trends in Bio*, p. 117-122, 2004.
- [8] JOVIC S, B. C. **Protein structure determination by electron cryo-microscopy.** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 9, 636–642, 2009.
- [9] FOTIADIS,, Dimitrios; FREDERIX,, Patrick L.t.m.; ENGEL, Andreas. *Cell biology: A Laboratory Handbook*. Basel: University Of Basel, p. 317-324, 2006.
- [10] CARVALHO, Fabiano Duarte. **Microscópio de tunelamento com varredura (STM) e microscópio de força atômica (AFM).** Unicamp.
- [11] KURNIAWAN, Fredy. **New Analytical Applications of Gold Nanoparticles.** 2008. Monografia . Universitat Regensburg. Surabaya, Indonésia.
- [12] AMENDOLA, Vincenzo; MENEGHETTI, Moreno. **Laser Ablation Synthesis in Solution and Size Manipulation of Noble Metal Nanoparticles.** *Physical chemistry chemical physics* , p.3805-3821. fev. 2009.
- [13] MARSILI, Sujoy K And; MARSILI, Enrico. **Nanobiotechnology; gold nanoparticles; microbial synthesis; living nanofactory; green chemical approach.** Dublin, 2009.
- [14] LOWE C. R. **Nanobiotechnology: The Fabrication and Applications of Chemical and Biological Nanostructures.** *Curr. Opi. Struct. Biol.*10: 428-434, 2000.
- [15] COOPER, G. M. *The Molecular Composition of Cells.in: The Cells A Molecular Approach.* 2ed. Boston, Boston University, 2000.
- [16] FERREIRA, Cecília Fabiana da Gama. **Preparo de Amostras Protéicas para Análise com Microscópio de Força Atômica.** 2006. Monografia (Graduação em Física) - URPR. Curitiba.
- [17] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. **Molecular Biology of the Cell.** : Garland Science. 4ed. Nova Iorque, 2002.
- [18] DURAN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, Z. **Nanotecnologia E Nanobiotecnologia: Conceitos Básicos,** Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Laboratório de Biotecnologia, Centro de Ciências Ambientais, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil
- [19] BERG, JM, TYMOCZKO, JL, STRYER, L. **Biochemistry.** W H Freeman. 5.ed. cap.8. Nova Iorque, 2002.
- [20] SIMÕES, R.; BEIRA, J.; MALCATA, R. **Composição química da célula - simbiotica.org, Estrutura da Lisozima, Metabolismo e Endocrinologia,** 2º Ano LEBM, 2006, <http://www.simbiotica.org/composicaoquimicacelula.htm>
- [21] CASTILHO, C.M.C. de, NASCIMENTO V.B. , SOARES, E.A., ESPIRIDÃO, A.S.C., MOTAL, F.B. e CARVALHO, V.E. **Difração de elétrons de baixa energia**

(LEED) e a determinação da estrutura atômica de superfícies ordenadas(*Lowenergyelectron diffraction and atomic structural determination of ordered surfaces*) *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 27, n. 4, p. 527 - 543, 2005
www.sbfisica.org.br

[22] DILYANA, Georgieva. **Electron Crystallography of Three Dimensional Protein Crystals**. (Tese de Doutorado) - Department of Biophysical Structural Chemistry, Faculty of Science, Leiden University. Leiden, 2008.

[23] FERREIRA, Cecília Fabiana da Gama. **Adsorção da Proteína GlnB de *Herbaspirillum soeropedicae* Sobre a Superfície da Mica Analisada por Microscopia de Força Atômica**. Monografia (Mestrado em FÍSICA) - UFPR. Curitiba, 2008.

[24] AZEVEDO W. F. **CRISTALIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS** Laboratório de Sistemas Biomoleculares. Departamento de Física-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, São José do Rio Preto. SP. www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br, 2004.

[25] TAKEDA, Y.; KONDOW, T.; MAFUNÉ, F. **Self-assembly of gold nanoparticles in protein crystal**. *Chemical Physics Letters*. v. 504. 2011, p. 175-179

[26] HODZHAOGLU F.; KURNIAWAN F., MIRSKY V.; NANEVC. **Gold nanoparticles induce protein crystallization** Received. 2008.

[27] STROM, C.S., BENNEMA, P. : **Combinatorial compatibility as habit-controlling factor in lysozyme crystallization I. Monomeric and tetrameric F faces derived** *Journal of Crystal Growth*. v. 173. 1997. p. 150-158

[28] SANTOS ,N. C.; CASTANHO, B. ; MIGUEL, A.R.B, **An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy**. *Biophysical Chemistry* v. 107. 2004. p. 133-149.

[29] WIECHMANN, M. **Analysis of protein crystal growth at molecular resolution by atomic force microscopy**, Institute of Biophysics. Germany, 2000.

[30] SARTOR, Marta. **Dynamic light scattering**- University of California . San Diego.

[31] Manual LS Instruments: **Dynamic Light Scattering: Measuring The Particle Size Distribution**

[32] HOO, C M.; STAROSTIN, N.; WEST, P.; MECARTNEY, M. L. **A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions**. *Journal of Nanoparticle Research*. v. 10. 2008 p. 89-96.

[33] SALVADOR, M. C. O. **Biochemical characterisation of MX-4, a plant cysteine protease of broad specificity and high stability**. *Food Chemistry*. 2010.

[34]MANUAL MALVEN. **Caracterização de proteínas Usando Dynamic Static & Light técnicas de espalhamento de Malvern Instruments graph-theoretically**, *Laborato of solidState Chemistry, IJniversity of Nijmegen. Toemooiceld 6525 ED NiJmegen, The Netherlunds*Received, 1996.

[35]BROWNING. N. D., *et al.*.**EscanningTransmission Electron Microscopy: An Experimental Tool for Atomic Scale Interface Science**1Department of Physics (M/C 273), University of Illinois at Chicago,*Received: Out. 1999*

[36]LEMONS, R. A. & Quate, C. F. "Acoustic microscope--scanning version." *Appl. Phys. Lett.* 24, 1974. p.163-165.

[37]PADILHA A. F. **Microscopia Eletrônica de Transmissão** *Angelo Fernando PadilhaProfessor Titular do Departamento deEngenharia Metalúrgica e de Materiaisda EP USP*

[38]SIGLE, W. **ANALYTICAL TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY** *Max-Planck-Institut f'ur Metallforschung*,2005.

[39]MASOVER, William H. **New and unconventional approaches for advancing resolution in biological transmission electron microscopy by improving macromolecular specimen preparation and preservation** ,2010.

[40]RUPRECHTA ,Jonathan; NIELDB,Jon. **Determining the structure of biological macromolecules by transmission electron microscopy, single particle analysis and 3Dreconstruction.**

[41]LQES:**Cálculo das Distâncias Interplanares e do Volume de Celas Unitárias**, LQES INDEX*Editoria do LQES Website- Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP*, <http://lqes.iqm.unicamp.br>

[42] Fonte da Figura 2.17. Disponível em :

<http://science.nasa.gov/media/medialibrary/1997/07/07/msad07jul97_1_resources/mol_ecule.gif> Acesso em 25/11/2011.

[43] BLEICHER,L. e SASAKI, J. M. **Introdução À Difração De Raios-X Em Cristais** Universidade Federal do Ceará, 2000.

[44] AZEVEDO, W. F. Processamento de dados de difração,2009. Azevedolab.net

[45] CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5ed. LTC, São Paulo, 2002.

[46]HEIMENDAHL, M.V. **Electron Microscopy of Materials** - An Introduction, Academic, N.Y,1980

[47] Sigma-Aldrich. Disponível em :

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONC_AT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=L6876%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC> acesso 23 de novembro de 2011 às 14:47h.

[48]CHERNOV, A. A. Structures of two forms of sodium acetate, $\text{Na}^+ \cdot \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ *Acta Cryst.v.39,1983. C39, 690-694.*

[49] Steffen Weber Homepage. Disponível em:

<<http://www.jcrystal.com/steffenweber/>> Acesso 25/11/2011.